



**Aléxia de Assis Vaz Santos Rodrigues**  
Licenciatura em Ciências de Engenharia do Ambiente

## **Plano de Gestão de Águas Residuais de uma Unidade Industrial de Produção de Microalgas — Caso de Estudo: Algafarm —**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia do Ambiente – Perfil de Engenharia de Sistemas Ambientais

Orientadora: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Mestre Joana Coelho da Silva, Algafarm

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Santos Coelho

Vogais: Professora Doutora Leonor Monteiro do Amaral

Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2015



**Plano de Gestão de Águas Residuais de uma Unidade Industrial de Produção de Microalgas – Caso de Estudo:  
Algafarm**

Copyright © em nome de Aléxia de Assis Vaz Santos Rodrigues da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

A presente dissertação não foi escrita ao abrigo do novo acordo ortográfico em vigor.



*Se é difícil, é porque estás no caminho certo...*



## Agradecimentos

À professora Rita Maurício por todo o empenho, incentivo e disponibilidade que demonstrou ao longo da elaboração da dissertação. A toda a confiança que depositou nas minhas capacidades e pela força que me deu, especialmente, na fase final.

À Algafarm pela oportunidade que me foi dada para desenvolver a presente dissertação, bem como a confiança e aposta nas minhas capacidades. A todos os colaboradores da Algafarm, em especial à minha orientadora local, Joana Coelho da Silva que sempre me incentivou e mostrou a sua disponibilidade mesmo nas fases menos boas. Pela sua paciência, compreensão e amizade prestadas, em particular, na fase final. Também agradeço à responsável de laboratório, Ana Marques, que teve muita paciência e se mostrou disponível para me auxiliar durante o trabalho laboratorial desenvolvido.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio, especialmente por parte do meu irmão Pedro que sempre me incentivou a não desistir.

A todos os meus amigos que estiveram sempre a meu lado. Em particular à Lála, Marta e Sónia que sempre estiveram disponíveis para me aturarem e darem força.

A todos vós, um muito obrigado pela vossa compreensão, paciência e apoio. Sem vocês terminar a dissertação teria sido mais difícil e menos feliz.





## Resumo

As microalgas pertencem ao grupo de microrganismos mais primitivos existentes no planeta Terra. São organismos fotossintéticos contribuindo assim, para a existência de vida no planeta. Além desta contribuição, e devido ao seu elevado valor nutricional foram sendo utilizadas, por alguns povos, desde há milhares de anos, como fonte de alimento. Hoje em dia, a preocupação com os ecossistemas tem tido uma relevância maior tendo surgido um novo interesse por estes organismos, tendo sido aplicados em diversos tipos de indústrias.

A presente dissertação apresenta um estudo que decorreu de um trabalho desenvolvido, numa unidade de produção de microalgas, a Algafarm. O objectivo do estudo realizado visou o desenvolvimento um plano de gestão dos efluentes produzidos na referida unidade. Para tal, procedeu-se à identificação e caracterização dos vários tipos de fluxos, que são parte integrante dos efluentes.

Este trabalho permitiu identificar sinais de alarme mais relevantes, aquando da descarga de efluentes, assim como, um plano de gestão de efluentes. Este plano de gestão considerou, por um lado, a diminuição do volume de efluentes produzidos, e por outro, propostas de reutilização de diversos fluxos gerados e que contribuem para o aumento e degradação do efluente final da instalação. As propostas foram definidas em escalas temporais diferentes: curto, médio e longo prazo. Estas propostas passam essencialmente pela reutilização dos fluxos produzidos através da sua aplicação como água de enxaguamento ou até como água de rega. A curto prazo, não há necessidade de qualquer investimento financeiro, apenas existe a necessidade de fazer uma reorganização do trabalho efectuado. A médio e longo prazos foram considerados investimentos para implementação de propostas realizadas, contudo, esse investimento fará com que haja retorno económico uma vez que a Algafarm terá um maior leque de oferta. Assim, considera-se que caso a Algafarm implemente as propostas sugeridas, a sua rentabilidade irá aumentar.

**Palavras-chave:** microalgas, *Chlorella vulgaris*, efluentes, potencial de reutilização, plano de gestão.



# Abstract

Microalgae belong to the most primitive organisms on planet Earth. As photosynthetic microorganisms they have contributed to the production of oxygen and therefore to the development of life itself. Their high nutritional value has led to their use as food source for the human population for thousands of years. Nowadays the growing concern with Earth's ecosystems has awakened a new interest in these microorganisms, and their applicability in different industries.

This thesis describes a case study developed in a microalgae production unit – Algafarm. The goal of this study is the development of a wastewater management plan. In order to do so, a detailed identification and characterization of the various fluids that make up the totality of effluent was carried out.

This work has identified alarm signals to take under consideration when discharging the effluents to the city waste water system and also an wastewater management plan. This plan is based on one hand on the decrease of the effluents produced and on the other hand on the proposal of several re-utilizations for the diverse fluids produced. The proposals are divided into short, medium and long term due to their different scale in initial investment. These proposals pass essentially by reuse of flows generated using as rinsing water or even as irrigation water. The short term proposal needs no investment, only re-organization of the work and planning already being done. The medium and long term investment needed for the implementation of the proposed solutions was studied. This investment will generate economic return as it will allow Algafarm to have greater scope of solutions available. Therefore, if the proposed solutions are implemented Algafarm will improve its profitability.

**Keywords:** microalgae, *Chlorella vulgaris*, wastewater, reuse potential, management plan.



# Índice

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                       | 1  |
| 1.1. Definição do âmbito.....            | 1  |
| 1.2. Objectivo .....                     | 2  |
| 1.3. Estrutura da dissertação .....      | 3  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....            | 5  |
| 2.1. História das Microalgas .....       | 5  |
| 2.2. Campos de aplicação.....            | 8  |
| 2.2.1. Nutrição e saúde humana .....     | 10 |
| 2.2.2. Nutrição animal.....              | 15 |
| 2.2.3. Ambiente.....                     | 18 |
| 2.3. Modos de produção.....              | 24 |
| 2.4. Conceito de biorrefinaria .....     | 29 |
| 3. CASO DE ESTUDO – ALGAFARM.....        | 31 |
| 3.1. Enquadramento .....                 | 31 |
| 3.2. Modo de produção.....               | 33 |
| 3.3. Normas de descarga.....             | 36 |
| 4. METODOLOGIA .....                     | 39 |
| 4.1. Tipo de análises e parâmetros ..... | 39 |
| 4.2. Análise quantitativa .....          | 41 |
| 4.2.1. <i>Reports</i> automáticos .....  | 41 |
| 4.2.2. Processamento .....               | 41 |
| 4.2.3. Ordens de limpeza.....            | 42 |
| 4.3. Análise qualitativa .....           | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3.1. <i>Reports</i> automáticos ..... | 43 |
| 4.3.2. Análise dos fluxos .....         | 43 |
| 4.3.2.1. Plano de amostragem .....      | 43 |
| 4.3.2.2. Preparação das amostras.....   | 44 |
| 4.3.2.3. Parâmetros analisados .....    | 48 |
| 4.3.2.4. Métodos.....                   | 49 |
| 5. RESULTADOS.....                      | 51 |
| 5.1. Análise quantitativa .....         | 51 |
| 5.1.1. <i>Reports</i> automáticos ..... | 51 |
| 5.1.2. Processamento.....               | 52 |
| 5.1.3. Ordens de limpeza.....           | 52 |
| 5.2. Análise qualitativa.....           | 55 |
| 5.2.1. <i>Reports</i> automáticos ..... | 55 |
| 5.2.2. Análise dos fluxos .....         | 57 |
| 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....        | 65 |
| 6.1. Análise quantitativa .....         | 65 |
| 6.2. Análise qualitativa.....           | 65 |
| 6.3. Potenciais de reutilização .....   | 67 |
| 6.4. Plano de gestão de efluentes.....  | 69 |
| 7. CONCLUSÕES .....                     | 73 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....     | 75 |
| ANEXO I .....                           | 79 |

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1 – <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 5  |
| Figura 2.2 – <i>Spirulina</i> .....   | 6  |
| Figura 2.3 – <i>Dunaliella salina</i> (à esquerda) e <i>Haematococcus pluvialis</i> (à direita) .....   | 7  |
| Figura 2.4 – Cronologia das principais espécies de microalgas produzidas comercialmente.....  | 8  |
| Figura 2.5 - Campos de aplicação das microalgas .....   | 8  |
| Figura 2.6 - Mecanismos utilizados em cada tipo de sistema .....  | 27 |
| Figura 2.7 – Raceway (imagem superior esquerda), PBR's planos (imagem superior direita), tubulares (imagem inferior esquerda) e em coluna (imagem inferior direita) ..... | 28 |
| Figura 2.8 - Esquematização de uma possível biorrefinaria para <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 30 |
| Figura 3.1 - Fotobiorreactores S e M da Algafarm .....  | 31 |
| Figura 3.2 – Fotobiorreactores L da Algafarm.....   | 32 |
| Figura 3.3 - Esquematização do <i>scale up</i> seguido pela Algafarm.....   | 33 |
| Figura 3.4 - Etapas do processo de limpeza .....  | 35 |
| Figura 4.1 - Esquema da análise quantitativa .....  | 42 |
| Figura 5.1 - Volume de efluentes descarregados por semana.....  | 51 |
| Figura 5.2 - Volume de efluentes descarregados em cada mês.....   | 51 |
| Figura 5.3 - Efluentes gerados pela limpeza dos PBR's, por mês .....  | 53 |
| Figura 5.4 - Constituição dos efluentes gerados durante a limpeza .....   | 54 |
| Figura 5.5 - Constituição dos efluentes produzidos, por mês.....  | 54 |
| Figura 5.6 - Evolução do pH.....  | 55 |
| Figura 5.7 - Evolução da temperatura .....  | 56 |
| Figura 5.8 - Evolução da condutividade .....  | 56 |
| Figura 5.9 – Evolução da turvação.....  | 57 |
| Figura 5.10 - Resultados vs norma de descarga: pH .....   | 60 |
| Figura 5.11 - Resultados vs norma de descarga: turvação.....  | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 5.12 - Resultados vs norma de descarga: condutividade .....   | 61 |
| Figura 5.13 - Resultados vs norma de descarga: cloretos totais ..... | 61 |
| Figura 5.14 - Resultados vs norma de descarga: detergentes .....     | 62 |
| Figura 5.15 - Resultados vs norma de descarga: SST .....             | 62 |
| Figura 5.16 - Resultados vs DL nº 236/98: pH .....                   | 63 |
| Figura 5.17 - Resultados vs DL nº 236/98: cloretos totais.....       | 63 |
| Figura 5.18 - Resultados vs DL nº 236/98: nitratos .....             | 64 |
| Figura 5.19 - Resultados vs DL nº 236/98: SST .....                  | 64 |
| Figura A.1 – <i>pH Meter</i> .....                                   | 79 |
| Figura A.2 - Kit para a análise de cloretos (HI3815) .....           | 80 |
| Figura A.3 – Balança analítica.....                                  | 81 |
| Figura A.4 - Centrífuga.....   | 82 |
| Figura A.5 - Vórtex.....   | 83 |
| Figura A.6 - Espectrofotómetro.....                                  | 84 |
| Figura A.7 – Bomba de vácuo.....                                     | 85 |
| Figura A.8 – Balança de humidade .....                               | 86 |



## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 2.1 - Principais compostos de microalgas com elevado interesse .....                          | 9  |
| Tabela 2.2 - Aplicações de diversas microalgas, países produtores, produtividade e valor comercial   | 10 |
| Tabela 2.3 - Composição da biomassa expressa em relação ao seu peso seco .....                       | 12 |
| Tabela 2.4 - Ácidos gordos polinsaturados: microalgas produtoras e o seu potencial de utilização ... | 14 |
| Tabela 2.5 - Teor de óleo presente em diversas microalgas .....                                      | 21 |
| Tabela 2.6 - Características de cada tipo de produção .....  | 24 |
| Tabela 2.7 - Resumo das vantagens e limitações dos diferentes tipos de mecanismos de produção .      | 29 |
| Tabela 3.1 - Correspondência entre os tamanhos dos fotobiorreactores e a sua capacidade.....         | 32 |
| Tabela 3.2 - Normas de descarga dos Serviços Municipalizados de Alcobaça.....                        | 37 |
| Tabela 4.1 - Identificação e descrição dos parâmetros seleccionados .....                            | 40 |
| Tabela 4.2 - Plano de amostragem.....  | 44 |
| Tabela 4.3 - Número de amostras recolhidas em cada semana .....                                      | 45 |
| Tabela 4.4 - Sistematização das amostras preparadas para análise e código correspondente.....        | 47 |
| Tabela 4.5 - Parâmetros analisados em cada tipo de fluxo.....  | 48 |
| Tabela 4.6 - Métodos adoptados para a análise dos diferentes parâmetros .....                        | 49 |
| Tabela 5.1 - Volumes envolvidos na fase do processamento .....                                       | 52 |
| Tabela 5.2 – Efluentes gerados durante a operação de limpeza de cada tipo de PBR .....               | 53 |
| Tabela 5.3 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 1 .....                         | 57 |
| Tabela 5.4 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 2 .....                         | 58 |
| Tabela 5.5 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 3 .....                         | 58 |
| Tabela 5.6 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 4 .....                         | 59 |



## Abreviaturas e Acrónimos

|                  |  |
|------------------|--|
| AE1              | Água de Enxaguamento 1   |
| AE2              | Água de Enxaguamento 2   |
| ARA              | Ácido araquidónico ( <i>Arachidonic acid</i> )                                     |
| CBO <sub>5</sub> | Carência Bioquímica de Oxigénio (após 5 dias)                                      |
| CQO              | Carência Química de Oxigénio   |
| DHA              | Ácido docosahexaenóico ( <i>Docosahexaenoic acid</i> )                             |
| EN               | Norma Europeia ( <i>European Norm</i> )  |
| EPA              | Ácido eicosapentaenóico ( <i>Eicosapentaenoic acid</i> )                           |
| GAL              | Ácido gama-linolénico ( <i>Gamma linolenic acid</i> )                              |
| MBAS             | Substâncias Ativas ao Azul-de-Metileno ( <i>Methylene Blue Active Substances</i> ) |
| MUFA             | Ácido gordo monoinsaturado ( <i>Monounsaturated Fatty Acid</i> )                   |
| PBR              | Fotobiorreactor de produção ( <i>Photobiorreactor</i> )                            |
| PUFA             | Ácido gordo polinsaturado ( <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i> )                    |
| rpm              | Rotações por minuto  |
| SFA              | Ácido gordo saturado ( <i>Saturated Fatty Acid</i> )                               |
| SMEWW            | <i>Standard Methods For The Examination Of Water &amp; Wastewater</i>              |
| SST              | Sólidos Suspensos Totais   |
| TOC              | Carbono Orgânico Total ( <i>Total Organic Carbon</i> )                             |
| UV               | Ultravioleta   |



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Definição do âmbito

A publicação do Relatório Brundtland, em 1987, fez despertar uma nova consciência para o desenvolvimento sustentável. Foi neste relatório que o conceito surgiu pela primeira vez, alertando a sociedade para o consumo excessivo de recursos naturais sem a consideração das suas capacidades de suporte para os ecossistemas. Os recursos fósseis para além de terem reservas limitadas, estão na origem de grande parte das emissões para a atmosfera de gases de efeito de estufa, dos quais se destaca o dióxido de carbono, facto esse que colide com o que se designa por sustentabilidade. Em 1997, foi publicado o Protocolo Quioto com o intuito de reduzir a emissão dos gases de efeito de estufa através da redução do consumo energético. Este acontecimento fez com que se sucedessem vários investimentos para unidades de investigação e desenvolvimento no sector das energias renováveis. Um dos sectores mais promissores deste tipo de energias foi e é, o da bioenergia, das quais se destacam as indústrias da biomassa e dos biocombustíveis (Rosa, 2011; Russo, 2011).

Deste modo, surgiu o interesse pela utilização de microalgas neste tipo de indústrias. Os referidos microrganismos, para além do elevado potencial de matéria-prima que possuem, têm ainda a capacidade de fixar dióxido de carbono, o que faz com que a sua produção seja altamente sustentável e importante. As múltiplas aplicações que possuem, desde a alimentação humana e animal, até à produção de biocombustíveis, bem como o próprio processo de produção, que permite mitigar as emissões de dióxido de carbono, faz com que o seu interesse aumente (Allma, 2012) <sup>1</sup>.

Em termos práticos, a produção de microalgas é fácil de realizar, visto serem organismos fotossintéticos e a água que necessitam não exigir um padrão de qualidade elevado. Aliás, através de água imprópria para o consumo humano, as microalgas conseguem obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. As taxas de crescimento e produtividade são elevadas quando comparadas com a silvicultura, culturas agrícolas ou outras plantas aquáticas, exigindo menos espaço que outras matérias-primas. A sua produção apresenta diversas vantagens, nomeadamente:

- 🌀 Elevado rácio de crescimento;
- 🌀 Menor necessidade de água que outras culturas vegetais terrestres;
- 🌀 Menor ocupação de terrenos;

---

<sup>1</sup> Recurso online.

- ⌘ Possibilidade de utilização de terrenos impróprios para agricultura;
- ⌘ Utilização de águas residuais urbanas ou industriais como fonte de nutrientes;
- ⌘ Possibilidade de obter elevadas concentrações de biomassa e conteúdo lipídico em condições ideais de cultivo;
- ⌘ Elevada eficiência de redução de CO<sub>2</sub>.

Contudo, a sua produção também tem as suas desvantagens tais como:

- ⌘ Elevado investimento inicial;
- ⌘ Adição de nutrientes potencialmente contaminantes;
- ⌘ Condições ideais do ambiente envolvente muito restritas;
- ⌘ Custos de manutenção de equipamentos elevados;
- ⌘ Dificuldades de controlo das condições de cultivo, quando em larga escala;
- ⌘ Elevada utilização de solventes na etapa de extração transesterificação;
- ⌘ Elevado consumo energético em todas as fases do processamento.

(Duarte, 2013)

Durante o processamento das culturas colhidas, a etapa de concentração da cultura gera um considerável volume de efluentes, embora estes sejam basicamente constituídos por água e resíduos de matéria orgânica. Este aspecto deve-se, essencialmente, aos critérios definidos para que se obtenha a concentração desejada. Deste modo, e também para tornar este tipo de produção mais sustentável, é estritamente necessário avaliar os eventuais campos de aplicação para a reutilização deste tipo de efluentes.

## 1.2. Objectivo

A presente dissertação teve como objectivo o desenvolvimento de um plano de gestão dos efluentes da Unidade de Produção de Microalgas - Algafarm. Foi baseado no aumento do nível de sustentabilidade da produção na Algafarm. Para tal, foi necessário efectuar uma caracterização rigorosa, quer em termos quantitativos quer em termos qualitativos, de todos os efluentes produzidos no processo de produção de microalgas. Este estudo está inserido no trabalho desenvolvido durante o período em que decorreu o estágio curricular na Algafarm.

### **1.3. Estrutura da dissertação**

A presente dissertação é composta por oito capítulos, organizados da seguinte forma:

**Capítulo 1: Introdução** → Definição do âmbito da dissertação, bem como os seus objectivos e estrutura.

**Capítulo 2: Revisão bibliográfica** → Estudo e análise das microalgas: a sua história, os vários campos de aplicação e diferentes métodos de produção.

**Capítulo 3: Caso de estudo - Algafarm** → Caracterização do caso de estudo, ou seja, o modo de produção na Algafarm e as normas pelas quais é regida, definição do tipo de análises efectuadas, bem como os parâmetros analisados.

**Capítulo 4: Metodologia** → Descrição pormenorizada dos métodos adoptados para os diferentes tipos de análises abordadas, quantitativa e qualitativa.

**Capítulo 5: Resultados** → Apresentação dos resultados obtidos.

**Capítulo 6: Discussão dos resultados** → Interpretação dos resultados. Neste capítulo foi avaliado o potencial de reutilização dos fluxos definidos de acordo com os resultados obtidos nas diversas análises e foi feita a identificação dos sinais de alarme. De acordo com a interpretação efectuada, foi proposto um plano de gestão dos fluxos. No final deste capítulo, fizeram-se propostas para poderem ser consideradas como investimento a médio e longo prazo.

**Capítulo 7: Considerações finais** → Conclusões gerais dos modos de produção actual e de produção com as propostas realizadas implementadas, de forma a identificar as medidas imprescindíveis para uma consciente e sustentável gestão dos efluentes.

**Capítulo 8: Referências bibliográficas.**





## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. História das Microalgas

As microalgas pertencem ao grupo de organismos primitivos que possibilitou a vida no planeta Terra. Estudos afirmam que a sua presença no planeta surgiu à 2,7 bilhões de anos e que estas são muito provavelmente os ancestrais das plantas, tendo dado origem a outras plantas marinhas. Salienta-se o facto de as microalgas terem um elevado valor nutricional e, por isso, terem sido utilizadas como fonte de alimento pelos Astecas e outras civilizações Mesoamericanas. De entre as diversas microalgas consumidas por estes povos destacam-se as espécies pertencentes aos géneros *Nostoc*, *Arthrospira*, mais especificamente a *Spirulina*, e *Aphanizomenon*. Embora as microalgas já tenham servido de alimento à milhares de anos, o seu cultivo é uma realidade com somente algumas décadas (Safi *et al.*, 2014; Spolaore *et al.*, 2006).

Assim sendo, só em 1890 é que surgiram as primeiras culturas de microalgas pela mão de Beijerinck. A espécie presente nestas culturas era a *Chlorella vulgaris* (figura 2.1) que, anos mais tarde, serviu de base para o estudo da fisiologia, estudo este levado a cabo, em 1919, por Warburg. O interesse pelas culturas deste tipo de organismos levou a que se tornassem alvo de investigação na Universidade de Stanford, nos Estados Unidos da América, em Essen, na Alemanha, em Tóquio. Burlew, em 1953, editou um livro onde estes primeiros estudos se encontram sintetizados. Estes estudos basearam-se na análise sistemática de microalgas para substâncias biologicamente activas, especialmente antibióticos, bem como na utilização de microalgas em viagens espaciais e na redução das emissões de dióxido de carbono por serem organismos fotossintéticos (Borowitzka, 1999; Spolaore *et al.*, 2006).

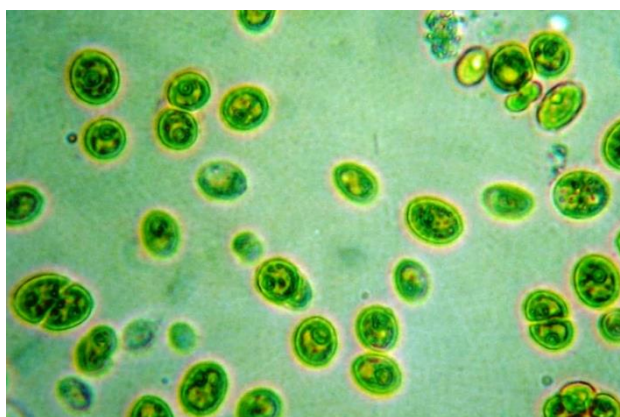


Figura 2.1 - *Chlorella vulgaris*.

(Fonte: [https://healthyposts.files.wordpress.com/2013/09/chlorella\\_image2\\_cells\\_290711.jpg](https://healthyposts.files.wordpress.com/2013/09/chlorella_image2_cells_290711.jpg))

No início da década de 1950, o aumento da população e as previsões de reservas insuficientes de proteínas para alimentação fez com que se despoletasse uma procura por novas alternativas e fontes não-convencionais de proteínas. Foi durante a Segunda Guerra Mundial que ocorreram as primeiras tentativas de cultivo de microalgas. Estas foram efectuadas por alemães, em tanques abertos, com o principal objectivo de serem utilizadas como suplementos alimentares (Ugwu *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2005).

A produção comercial em grande escala começou na década de 1960, no Japão, com culturas de *Chlorella*, em sistema aberto, isto é, em lagoas. Ainda nesta década, uma descoberta sobre os hábitos alimentares dos povos indígenas que viviam nas proximidades do Lago Chade, em África, sugeriu a produção de outra espécie de microalgas. Estes povos incluíam na sua alimentação a *Spirulina* (figura 2.2) que se encontrava em abundância neste Lago devido às suas características, nomeadamente a alcalinidade e temperaturas a que está sujeito. A primeira produção comercial de *Spirulina* foi concretizada através da Sosa Texcoco S.A., nos anos de 1970, no Lago de Texcoco no México. Na mesma época, deram-se os primeiros passos na utilização das microalgas em aquicultura (Walker *et al.*, 2005; Spolaore *et al.*, 2006; Lundquist *et al.*, 2010).

O aumento da produção de microalgas foi de tal modo elevado que em 1980 já existiam 46 unidades de produção em grande escala, por toda a Ásia. As quantidades produzidas ultrapassavam os 1000kg por mês, dos quais a maioria correspondia a biomassa de *Chlorella* (Spolaore *et al.*, 2006).

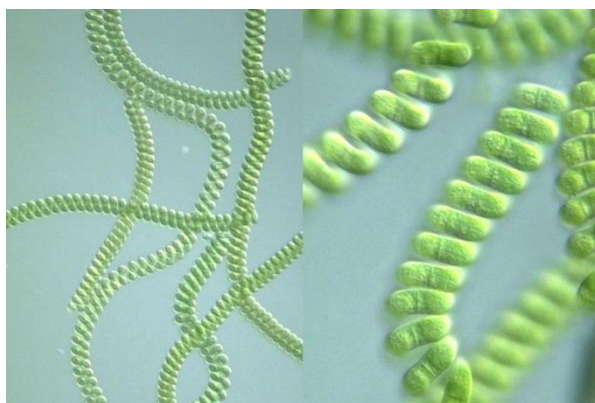


Figura 2.2 - *Spirulina*.

(Fonte: <http://www.mc-100.com/M-74/m-74.html>)

A crise económica que ocorreu na década de 1970, originada pela queda do valor petróleo, desencadeou um novo interesse de aplicação de microalgas no campo das energias renováveis. Nos Estados Unidos da América implementaram-se tecnologias ambientais como sistemas de

tanques de microalgas, com o intuito de melhorar a qualidade final das águas residuais, e a fermentação da biomassa resultante, dando origem a metano, tendo sido uma das principais fontes de energia durante a crise (Ugwu *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006).

Nos anos seguintes iniciaram-se novas produções comerciais. Em 1977, na Tailândia, a Dai Nippon Ink and Chemicals Inc. foi a responsável pela produção comercial de *Spirulina*. O Japão foi um dos maiores responsáveis pela produção e comercialização de microalgas, destacando-se sobretudo a *Chlorella*. Em 1996 já tinham sido comercializadas cerca de 2000 toneladas desta microalga. Sendo a produção de *Chlorella* a maior indústria neste campo, seguida pela produção de *Spirulina*. Mais tarde, em 1986, a *Dunaliella salina* (figura 2.3) começou a ser produzida devido ao seu alto teor de carotenóides, em particular  $\beta$ -caroteno. A comercialização realizada pela Western Biotechnology e pela Betatene, ambas localizadas na Austrália, tornou a produção comercial de *Dunaliella salina* na terceira maior indústria de microalgas. Israel e os Estados Unidos da América seguiram os mesmos passos, embora com diferentes microalgas. Mais recentemente, nos Estados Unidos da América e na Índia, foram instaladas unidades de produção de *Haematococcus pluvialis* (figura 2.3), com o propósito de produzir astaxantina (Borowitzka, 1999; Spolaore *et al.*, 2006; Lundquist *et al.*, 2010).

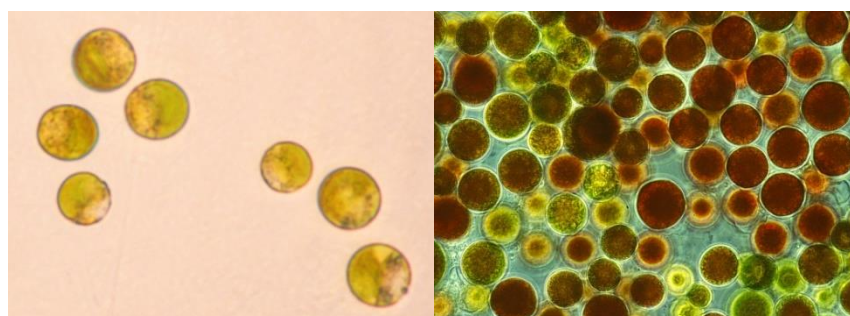


Figura 2.3 - *Dunaliella salina* (à esquerda) e *Haematococcus pluvialis* (à direita).

(Fontes: <http://biotex.ibss.org.ua/gallery/8/?catid=8&lang=en> e <http://zdraveriasy.webnode.sk/mikroriasy/haematococcus-pluvialis/>, respectivamente)

Ao longo dos anos, as microalgas foram ganhando notoriedade e importância devido à sua vasta aplicabilidade em diversos campos, em especial no domínio da aquicultura. Recentemente, as microalgas têm despoletado um grande interesse no que diz respeito às suas potencialidades na produção de produtos de química fina e suplementos alimentares tanto para humanos como animais. Também têm sido aplicadas como sistemas de estabilização para a produção de alguns compostos extracelulares, como bioacumuladores de metais pesados e na fixação de dióxido de carbono. Verifica-se que num curto período de tempo, a indústria de

biotecnologia de microalgas cresceu e diversificou os seus campos de aplicação de um modo bastante significativo (Ugwu *et al.*, 2008; Borowitzka, 1999; Walker *et al.*, 2005).

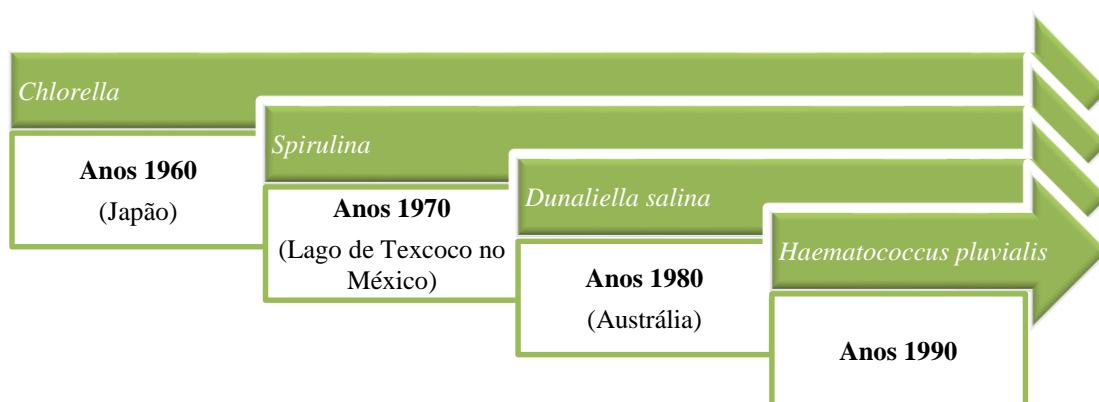


Figura 2.4 - Cronologia das principais espécies de microalgas produzidas comercialmente.

## 2.2. Campos de aplicação

As microalgas têm sido alvo de estudos ao longo dos anos. Os estudos revelaram que este tipo de organismo pode ser aplicado em diversos campos, com distintas finalidades. A figura 2.5 mostra os diferentes campos de aplicação bem como o objectivo em cada um deles.

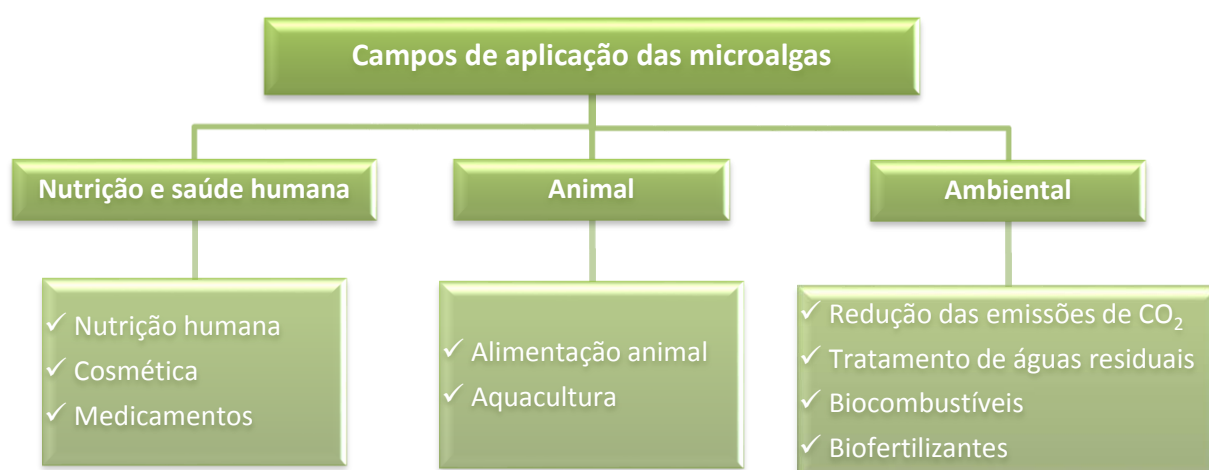


Figura 2.5 - Campos de aplicação das microalgas.

A diversidade dos compostos das diferentes espécies de microalgas faz com que estas tenham um vasto potencial de aplicação. Podem ser aplicadas em campos totalmente distintos

desde a cosmética aos biocombustíveis, isto é, indústrias com diferentes objectivos mas com bases de produção idênticas (Marques, 2014).

A tabela 2.1 mostra os compostos de maior interesse que se encontram presentes nas microalgas.

Tabela 2.1 - Principais compostos de microalgas com elevado interesse.

|  |  |
|--|--|
| <b>Pigmentos/Carotenóides</b>                | $\beta$ -caroteno, astaxantina, luteína, zeaxantina, cantaxantina, clorofila, ficocianina, ficoeritrina, fucoxantina   |
| <b>Ácidos Gordos Polinsaturados (PUFA's)</b> | Ácido docosahexaenóico (DHA), Ácido eicosapentaenóico (EPA), Ácido araquidónico (ARA), Ácido gama-linolénico (GAL)   |
| <b>Vitaminas</b>                             | A, B1, B2, B3, B5, B6, B12, C, E, ácido fólico, biotina  |
| <b>Antioxidantes</b>                         | Catalases, polifenóis, superóxido dismutase, tocoferóis  |
| <b>Outros compostos</b>                      | Antimicrobianos, antifúngicos, agentes anti-virais, toxinas, aminoácidos, proteínas, esteróis, micosporinas tipo aminoácidos para protecção contra os raios UV |

(adaptado de Priyadarshani e Rath, 2012)

A tabela 2.2 mostra as espécies mais utilizadas nos diversos campos de aplicação, bem como, o valor do seu produto, a sua taxa de produtividade anual e os correspondentes países produtores.

Tabela 2.2 - Aplicações de diversas microalgas, países produtores, produtividade e valor comercial.

| Microalga                       | País produtor                      | Produtividade anual | Aplicação e produto final                   | Valor comercial (€) |
|---------------------------------|------------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| <i>Spirulina</i>                | China, Índia, EUA, Birmânia, Japão | 3000t (peso seco)   | Nutrição humana                             | 36 €/kg             |
|                                 |                                    |                     | Nutrição animal                             |                     |
|                                 |                                    |                     | Cosméticos                                  |                     |
|                                 |                                    |                     | Ficobiliproteínas                           | 11000000 €/kg       |
| <i>Chlorella</i>                | Taiwan, Alemanha, Japão            | 2000t (peso seco)   | Nutrição humana                             | 36 €/kg             |
|                                 |                                    |                     | Cosméticos                                  | 50 €/l              |
|                                 |                                    |                     | Aquacultura                                 |                     |
| <i>Dunaliella salina</i>        | Austrália, Israel, EUA, Japão      | 1200t (peso seco)   | Nutrição humana<br>Cosméticos<br>β-caroteno | 215 - 2150 €/kg     |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | EUA                                | 500t (peso seco)    | Nutrição humana                             | -                   |
| <i>Haematococcus pluvialis</i>  | EUA, Índia, Israel                 | 300t (peso seco)    | Aquacultura                                 | 50 €/l              |
|                                 |                                    |                     | Astaxantina                                 | 7150 €/kg           |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i>    | EUA                                | 240t (DHA)          | DHA   | 43000 €/kg          |
| <i>Shizochytrium</i>            | EUA                                | 240t (DHA)          | DHA   | 43000 €/kg          |

(adaptado de Brennan e Owende, 2010)

### 2.2.1. Nutrição e saúde humana

O despertar pela utilização das microalgas na nutrição e saúde humana advém em grande parte da preocupação dos consumidores com certas doenças, como o colesterol, doenças cardíacas, osteoporose e cancro. Contudo, parte deste cuidado deve-se ao interesse em analisar a ligação entre os medicamentos prescritos, para prevenir ou tratar este tipo de doenças, e todas as suas consequências no organismo. Deste facto e dos possíveis efeitos nocivos que alguns dos medicamentos tradicionais têm, surge o aumento no consumo de suplementos nutricionais tradicionalmente derivados de plantas. O consumo humano de biomassa algal é restrito a poucas espécies devido às estritas normas de segurança alimentar, factores comerciais, procura do mercado e preparação específica. Esta biomassa é apresentada ao cliente sob a forma de comprimidos ou simplesmente em pó, como aditivo alimentar, no mercado de alimentos saudáveis (Mata *et al.*, 2010; Brennan e Owende, 2010).

A biomassa de microalgas é constituída por três compostos principais: proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Na tabela 2.3 apresenta-se o teor médio de cada um destes três compostos na composição da biomassa de várias espécies de microalgas. Como indicado anteriormente, o consumo humano de biomassa é restrita a poucas espécies, destacam-se então as espécies que dominam o mercado: a *Chlorella*, a *Spirulina* e a *Dunaliella* (Priyadarshani e Rath, 2012; Brennan e Owende, 2010; Walker *et al.*, 2005).

Tabela 2.3 - Composição da biomassa expressa em relação ao seu peso seco.

| Espécie                          | Proteína (%) | Hidratos de carbono (%) | Lípidos (%) |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| <i>Anabaena cylindrica</i>       | 43 – 56      | 25 – 30                 | 4 – 7       |
| <i>Botryococcus braunii</i>      | 40           | 2                       | 33          |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 48           | 17                      | 21          |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>     | 57           | 26                      | 2           |
| <i>Chlorella vulgaris</i>        | 41 – 58      | 12 – 17                 | 10 – 22     |
| <i>Dunaliella bioculata</i>      | 49           | 4                       | 8           |
| <i>Dunaliella salina</i>         | 57           | 32                      | 6           |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i>    | 29           | 14                      | 11          |
| <i>Euglena gracilis</i>          | 39 – 61      | 14 – 18                 | 14 – 20     |
| <i>Porphyridium cruentum</i>     | 28 – 39      | 40 – 57                 | 9 – 14      |
| <i>Prymnesium parvum</i>         | 28 – 45      | 25 – 33                 | 22 – 39     |
| <i>Scenedesmus dimorphus</i>     | 8 – 18       | 21 – 52                 | 16 – 40     |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>      | 50 – 56      | 10 – 17                 | 12 – 14     |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>   | 47           | –                       | 1,9         |
| <i>Spirogyra sp.</i>             | 6 – 20       | 33 – 64                 | 11 – 21     |
| <i>Spirulina maxima</i>          | 60 – 71      | 13 – 16                 | 6 – 7       |
| <i>Spirulina platensis</i>       | 42 – 63      | 8 – 14                  | 4 – 11      |
| <i>Synechoccus sp.</i>           | 63           | 15                      | 11          |
| <i>Tetraselmis maculata</i>      | 52           | 15                      | 3           |

(adaptado de Priyadarshani e Rath, 2012)

A *Spirulina* tem sido utilizada como um alimento que estimula o sistema imunológico, ajudando a evitar, tanto infecções virais como cancro. Também tem sido indicada para o



aumento do número de bactérias do ácido láctico no tracto gastrointestinal, de modo a promover o equilíbrio hormonal no adulto saudável. As espécies *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis* são as mais populares. Quanto à *Chlorella*, esta apresenta vários benefícios para a saúde uma vez que aumenta as concentrações de hemoglobina, baixa os níveis de açúcar no sangue e actua como agente hipocolesterolémico e hepatoprotector durante a desnutrição e intoxicação por etionina. Nas espécies *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella ellipsoidea* existem complexos de polissacáridos que contêm glucose e qualquer combinação de galactose, ramnose, manose, arabinose, N-Acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina. Acredita-se que estes complexos tenham propriedades imunomoduladoras, especificamente estimulação da actividade imunológica e inibição da proliferação de *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*. Além disso, os extractos de *Chlorella* podem ser administrados a mamíferos com o objectivo de aumentar a proliferação de esplenócitos e de produzir de citocinas, e podem ainda ser utilizados como um suplemento para aumentar o estímulo da resposta imunológica (Mata *et al.*, 2010).

Não é apenas no mercado de suplementos alimentares que as microalgas têm sucesso. Outra possível aplicação é a utilização como corantes alimentares. Neste campo a microalga com maior êxito é a *Dunaliella salina*, fonte do pigmento fotossintético  $\beta$ -caroteno, que apresenta cor laranja (Priyadarshani e Rath, 2012; Walker *et al.*, 2005).

Os carotenóides têm uma importância nutricional e terapêutica elevada uma vez que, têm a capacidade de actuar como pró-vitamina A. Por outro lado, os carotenóides têm propriedades anti-inflamatórias intrínsecas, devido à sua acção supressiva sobre as espécies reactivas de oxigénio e, também, lhe é atribuído um efeito anticancerígeno. No caso específico da astaxantina, além de todos estes benefícios, ainda fornece uma protecção contra os raios UV, melhora a resposta imunológica, é um precursor hormonal, ajuda a manter a saúde cardiovascular, reduz o risco de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, protege a retina do olho de danos oxidativos e tem um efeito contra a doença macular degenerativa. A microalga responsável pela produção de astaxantina é a *Haematococcus pluvialis* (Priyadarshani e Rath, 2012; Spolaore *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2005).

Em relação a outros pigmentos, são também utilizados a ficoeritrina e a ficocianina que fazem parte das ficobiliproteínas, sendo produzidos pela cianobactéria *Arthrospira* e pela rodófito *Porphyridium cruentum*. As ficobiliproteínas são amplamente utilizadas na indústria e laboratórios clínicos ou de investigação imunologia. No caso da ficocianina além de ser utilizado como corante natural, substituindo os pigmentos sintéticos correntes,

estudos recentes expandiram a sua aplicação em biotecnologia. Devido às suas propriedades (alto coeficiente de absorvância molar, alto rendimento quântico de fluorescência, grande deslocamento de Stokes, elevada estabilidade de oligómeros e elevada fotoestabilidade), este pigmento é muito poderoso e altamente sensível a reagentes fluorescentes. Tal faz com que este possa ser utilizado como marcador para anti-corpos, receptores e outras moléculas biológicas para a separação de células consoante o seu nível de fluorescência, e em experiências e imunomarcacão e microscopia de fluorescência ou de diagnóstico (Spolaore *et al.*, 2006; Brennan e Owende, 2010).

As microalgas têm, ainda, outro composto de grande importância para a indústria farmacêutica e nutrição humana, os lípidos. Estes são constituídos em, elevada proporção, por ácidos gordos poliinsaturados (PUFA's), que se mostraram eficazes na prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, cancro, diabetes tipo II, doenças intestinais inflamatórias, asma, artrite, distúrbios da pele e rins, depressão e esquizofrenia. De entre este grupo de PUFA's, os de maior relevância são os ácidos gama-linolénico (GLA), araquidónico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA). A tabela 2.4 refere os diferentes potenciais de aplicação destes ácidos e as microalgas associadas a cada tipo de PUFA (Priyadarshani e Rath, 2012; Spolaore *et al.*, 2006).

Tabela 2.4 - Ácidos gordos polinsaturados: microalgas produtoras e o seu potencial de utilização.

| PUFA                                 | Potencial de aplicação   | Microalga  |
|--------------------------------------|--|--|
| <b>Ácido gama-linolénico (GLA)</b>   | Fórmulas infantis para bebés de termo<br>Suplementos nutricionais                              | <i>Arthrospira</i>   |
| <b>Ácido araquidónico (AA)</b>       | Fórmulas infantis para bebés prematuros ou de termo<br>Suplementos nutricionais                | <i>Porphyridium</i>  |
| <b>Ácido eicosapentaenóico (EPA)</b> | Suplementos nutricionais<br>Aquacultura  | <i>Nannochloropsis</i> ,<br><i>Phaeodactylum</i> ,<br><i>Nitzschia</i> |
| <b>Ácido docosahexaenóico (DHA)</b>  | Fórmulas infantis para bebés prematuros ou de termo<br>Suplementos nutricionais<br>Aquacultura | <i>Cryptocodinium</i> ,<br><i>Schizochytrium</i>                       |

(adaptado de Spolaore *et al.*, 2006)

Analogamente, as microalgas podem ser aplicadas no campo da cosmética, essencialmente em cuidados de rosto e pele, mas também na protecção solar e cuidados capilares. Os pigmentos são, também, utilizados para cosméticos naturais como batons e delineados. As espécies tipicamente utilizadas são *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Ascophyllum nodosum*, *Alaria esculenta*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina*. Existem duas empresas que alegam as propriedades das microalgas usadas nos seus produtos que estão disponíveis comercialmente. Do Mónaco, a Exsymol S.A.M. defende o extracto rico em proteínas de *Spirulina platensis* presente no produto *Protulines* que tem a capacidade de reparar os sinais de envelhecimento precoce, efeito reafirmante e prevenção de estrias. De França, a Codif afirma o efeito estimulante da síntese de colagénio da pele do produto *Dermochlorella*, o que resulta na regeneração de tecidos e na redução de rugas. Recentemente, a Pentapharm, da Suíça, lançou dois novos produtos com dois ingredientes provenientes de duas espécies distintas: o Pepha-Tight que é proveniente da *Nannochloropsis oculata* e que possui propriedades excelentes de firmeza da pele, com efeitos a curto e longo-prazo e o Pepha-Ctive proveniente da *Dunaliella salina* que apresenta a capacidade de estimular significativamente a proliferação e renovação celular e de influenciar de forma positiva o metabolismo energético da pele (Priyadarshani e Rath, 2012; Spolaore *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Nutrição animal**

A vida animal também pode beneficiar do potencial das microalgas. Neste caso estas podem ser aplicadas na alimentação animal, como suplementos, bem como na aquacultura.

No que diz respeito à alimentação, estima-se que cerca de 30% da produção de microalgas seja vendido como alimento para gado. Tal facto, deve-se à crescente procura de alimentos compostos por ingredientes naturais em vez de sintetizados. Esta procura desencadeou uma série de estudos com o objectivo de encontrar ingredientes naturais para melhorar a qualidade de produtos alimentares de origem animal (Safi *et al.*, 2014).

Cerca de 50% da produção comercial de microalgas destinadas a consumo animal corresponde ao género *Arthrospira*, sendo consumida por cães, gatos, peixes de aquário, aves ornamentais, cavalos, vacas e touros reprodutores. O consumo de microalgas interfere, positivamente, na fisiologia e físico animal. Está provado que ao serem fornecidas grandes quantidades de vitaminas naturais, minerais e ácidos gordos essenciais, a resposta imune é melhorada, tal como a fertilidade e o controlo do peso. Relativamente à condição física, os

animais que têm incluído na sua ração as microalgas apresentam uma pele saudável e pêlo brilhante. Nas rações destinadas a aves, as microalgas podem ser utilizadas como substituto parcial de proteínas convencionais num intervalo entre 5% e 10%. O consumo contínuo de alimentos com uma elevada concentração de microalgas podem surtir efeitos adversos, por exemplo, uma característica importante que é influenciada é a tonalidade amarela da pele e patas dos frangos, tal como a da gema do ovo (Spolaore *et al.*, 2006).

A espécie *Chlorella vulgaris* apresenta uma grande capacidade de acumular um elevado teor de carotenóides. Após ser introduzida na alimentação animal, como peixes e aves, revelou um potencial interessante na pigmentação dos peixes e gemas de ovo de frangos de aviário, conjuntamente com a melhoria do estado de saúde e aumento da esperança de vida destes animais. Por outro lado, esta microalga revelou ainda um efeito protector contra metais pesados e outros compostos nocivos (chumbo, cádmio, e naftaleno) através da significativa redução do *stress* oxidativo induzido por este tipo de compostos, bem como o aumento da actividade antioxidante do organismo dos animais que foram alvo de estudos (Safi *et al.*, 2014).

Posto isto, o *Institut für Getreideverarbeitung*, na Alemanha, produz um suplemento alimentar natural que resulta da conjugação de ambas as microalgas, *Arthrospira* e *Chlorella vulgaris*. O produto originado é designado por *Algrow* (Spolaore *et al.*, 2006).

As microalgas são a fonte de alimento natural de muitas espécies aquícolas importantes, tais como moluscos, camarões e peixes. No campo da aquacultura, as suas principais aplicações passam pela alimentação dos peixes, incluindo nutrição larval de moluscos ou camarão peneídeos, coloração de salmonídeos de viveiros, estabilização e melhoria da qualidade do meio de cultura (técnica "verde-água"), indução das actividades biológicas essenciais em espécies aquáticas produzidas, e reforço do sistema imunitário dos peixes (Brennan e Owende, 2010).

Neste campo, as espécies mais utilizadas são: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* and *Thalassiosira*. As espécies *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* são consideradas as melhores microalgas para alimento de larvas de bivalves, pois crescem melhor em águas marinhas não filtradas onde foram adicionadas estas espécies de microalgas. *Scenedesmus* em pó pode ser usado como alimento para as *Artemia* e a *Chlorella* (marinha, de água doce ou mesmo seca) adequa-se perfeitamente como alimento na produção de *Brachionus plicatilis*, excepto no caso de se tratar de amêijoas ou ostras (Priyadarshani e Rath, 2012; Mata *et al.*, 2010).

Embora tenham sido definidos requisitos nutricionais para o consumo de microalgas, não existe um critério nutricional concreto. Basicamente, estas devem ser microalgas não-tóxicas com um tamanho razoável para a sua ingestão, a sua parede celular tem de ser digerível, bem como possuir os compostos bioquímicos necessários. O teor de proteínas é o factor mais importante para determinar o valor nutricional das microalgas. Contudo, o teor de ácidos gordos insaturados é de extrema importância pois a sua concentração influencia o crescimento e metamorfose das larvas de peixe, ou seja, se estas serão saudáveis ou terão malformações. Os ácidos gordos com maior importância no desenvolvimento larval são os ácidos eicosapentaenóico (EPA), araquidónico (AA) e docosahexaenóico (DHA). No entanto, o rácio destes ácidos entre eles é mais importante do que principalmente os seus níveis absolutos (Priyadarshani e Rath, 2012; Mata *et al.*, 2010; Spolaore *et al.*, 2006).

O crescimento de microalgas, a serem aplicadas em aquacultura, pode ser diferenciado de duas formas:

- 1) Populações naturais de fitoplâncton, sejam como se encontram na natureza ou a criadas a partir de culturas enriquecidas com a adição de nutrientes. As suas principais desvantagens são a falta de controlo sobre a produção, o consumo de fitoplâncton por predadores indesejáveis, e contaminações por outras espécies que estão mais bem adaptadas às condições ambientais existentes, aos nutrientes disponíveis, e à composição de outras populações de algas.

- 2) Monoculturas de algas. Como por exemplo, quando se pretende uma fonte de alimento de alta qualidade cujas propriedades nutricionais são conhecidas ou bactérias livres em culturas de algas em que existe um reduzido risco de introdução de agentes patogénicos indesejáveis em culturas de origem animal. O grande obstáculo, em monoculturas de grande escala, é o facto de as microalgas serem susceptíveis à contaminação por vírus, bactérias ou fungos. Além disso, ficam expostas a predadores como protozoários, rotíferos, crustáceos e até mesmo a larvas de microplâncton de organismos bentónicos (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas além de serem uma fonte de alimento para o zooplâncton, também contribuem, para a estabilização e melhoria da qualidade do meio de cultura. A introdução de fitoplâncton para criar lagoas, através da técnica da água-verde, faz com que um grande número de espécies animais de água doce e marinha revele melhores taxas de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do que a técnica da água-cristalina apresenta. As razões para tal não são completamente conhecidas, mas estas podem incluir a melhoria na qualidade da

água e estabilização resultante do oxigénio produzido pelas microalgas e pela estabilização do pH, a acção de alguns em conjunto com a indução processos comportamentais, como presa inicial de captura, e a regulação da população bacteriana, efeitos pro-bióticos, e a estimulação da imunidade (Spolaore *et al.*, 2006).

As culturas de microalgas também podem ser aplicadas directamente enquanto estão vivas ou então indirectamente através de uma forma concentrada obtida após a sua colheita e processamento. Neste enquadramento insere-se o uso de pigmentos naturais para viveiros de camarões, peixes salmonídeos e peixes ornamentais, onde se destaca a microalga *Haematococcus pluvialis* como a mais promissora fonte natural de astaxantina que é sintetizada através do  $\beta$ -caroteno. Apesar das inúmeras vantagens da aplicação das microalgas na aquacultura, o elevado custo e dificuldades na produção, processamento e armazenamento destas tem levado à diminuição do seu uso. Na sequência destes factos, têm sido desenvolvidas dietas de substituição. No Japão, onde a mais importante fonte de alimento do rotífero *Brachionus plicatilis* é a microalga *Nannochloropsis oculata*, estão disponíveis suspensões concentradas e biomassa congelada desta. Em viveiros de peixes marinhos, a tendência é aplicar a técnica da água-cristalina em vez da técnica da água-verde. No entanto, a privação de microalgas desde o estado larval origina, na sua maioria, uma menor previsibilidade do desempenho da cultura. Contudo, as soluções apresentadas como substituição total do uso das microalgas na aquacultura não estão suficientemente desenvolvidas para que se adopte o total afastamento destas neste campo. Diversas avaliações nutricionais e toxicológicas confirmam que a biomassa das microalgas é apropriada para ser usada como suplemento alimentar. Ao longo das últimas quatro décadas, várias centenas de espécies de microalgas têm sido testadas como alimento, mas possivelmente só menos de vinte ganharam amplo uso na aquacultura (Mata *et al.*, 2010; Spolaore *et al.*, 2006; Priyadarshani e Rath, 2012).

### **2.2.3. Ambiente**

A nível ambiental as microalgas desempenham um papel de extrema importância, uma vez que são organismos fotossintéticos. Devido à acentuada preocupação da redução das emissões dos gases de efeitos de estufa, em particular o CO<sub>2</sub>, as microalgas enquadram-se na perfeição para minimizar e mitigar as emissões de CO<sub>2</sub>. Ao serem utilizadas para este fim produzem produtos que podem ser aplicados para diversos fins, como biofertilizantes e biocombustíveis.

A redução das emissões de CO<sub>2</sub> tem por base duas estratégias principais, uma relacionada com as reacções químicas e outra com os processos biológicos. A mitigação de CO<sub>2</sub> através de reacções químicas requer consumos energéticos, processos dispendiosos e ainda apresenta problemas na medida em que o CO<sub>2</sub> capturado bem como os seus absorventes precisam de ser eliminados. Por outro lado, a mitigação com base em processos biológicos têm despertado o interesse nos últimos anos pois durante a fotossíntese ocorre produção de energia, nomeadamente na constituição da biomassa. Os gases provenientes de centrais eléctricas são responsáveis por mais de 7% do total de emissões de CO<sub>2</sub> em todo o mundo. De igual modo, as emissões de gases industriais contêm cerca de 15% de CO<sub>2</sub>. Tal facto torna estas emissões numa fonte rica em CO<sub>2</sub> para a produção de microalgas e num processo potencialmente mais eficiente para a bio-fixação de CO<sub>2</sub>. Ou seja, através do uso de emissões dos gases de combustão como fonte de CO<sub>2</sub> para a produção de microalgas reduz-se significativamente as emissões de CO<sub>2</sub>, e ao mesmo tempo torna-se numa alternativa promissora para ser parte integrante das estratégias de mitigação de gases de efeito de estufa. Estudos laboratoriais sobre o uso da alga verde *Monoraphidium minutum*, levados a cabo por Zeiler *et al.*, demonstraram que esta alga consegue consumir de forma eficiente gases de combustão simulados para produção de biomassa. Estes gases continham níveis elevados de CO<sub>2</sub>, bem como de óxidos de enxofre e azoto. Outra alga verde estudada, a *Chlorophyta*, revelou a capacidade de fixar de CO<sub>2</sub>, enquanto utilizava a energia solar, com uma eficiência entre 10 e 50 vezes superior às plantas terrestres. Por estas razões, como as microalgas têm uma boa tolerância a níveis elevado de CO<sub>2</sub>, torna-se benéfica a sua aplicação para a mitigação de gases de efeito de estufa. A alga marinha, *Chlorococcum littorale*, também demonstrou uma tolerância excepcional a concentrações de CO<sub>2</sub> até 40%. Diversas espécies de *Chlorella* originárias de fontes termais mostraram-se tolerantes a temperaturas elevadas até 42°C para a fixação de CO<sub>2</sub> proveniente de emissões de gases industriais cuja concentração deste gás é de cerca de 40%. As microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella kessleri*, retiradas de lagoas de tratamento de resíduos da central termoelétrica a carvão Presidente Médici, apresentaram de igual modo uma boa tolerância a elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> (Benemann, 1997; Mata *et al.*, 2010).

A preocupação crescente com a qualidade das águas residuais para posterior descarga no ecossistema em conjunto com a mitigação das emissões de CO<sub>2</sub> levantou um novo interesse pelas microalgas. O uso destes organismos para o tratamento de águas residuais tem-se revelado promissor, nomeadamente na remoção de nutrientes, como o azoto e fósforo, CO<sub>2</sub>, metais pesados e elementos patogénicos presentes nestas águas, uma vez que

estes são utilizados no seu crescimento. Assim, o que torna viável a aplicação das microalgas no processo de tratamento de água residuais é sobretudo o facto de reduzir a remediação química, sendo uma técnica mais económica e minimizando o uso de água doce para a produção de biomassa. Assim, a elevada taxa de crescimento aliada à eliminação do nível de contaminação da água revela poder ser um processo promissor e vantajoso. Foram realizados vários estudos neste sentido, nomeadamente, o realizado por Aslan e Kapdan onde foi estudada a capacidade que a *Chlorella vulgaris* para a remoção de azoto e fósforo de águas residuais. O resultado foi uma eficiência média de remoção de 72% do azoto e 28% de fósforo, ou seja, entre 3 e 8 mg/l de  $\text{NH}_4^+$  e entre 1,5 e 3,5 mg/l de  $\text{PO}_4^{-3}$ . Outros estudos com *Chlorella vulgaris* produzida em PBR's demonstraram o seu potencial notável em fixar até 74% de  $\text{CO}_2$ . Também revelaram que tem uma enorme capacidade de absorção de nutrientes, entre 45 e 97% de azoto e entre 28 e 96% de fósforo, e ainda consegue diminuir entre 61% e 86% a carência química de oxigénio (CQO), a partir de diferentes tipos de águas residuais, tais como indústrias têxteis, domésticas, municipais, agrícolas, entre outras. Além da *Chlorella*, também, são amplamente utilizadas outras microalgas para a remoção de nutrientes como é o caso da *Scenedesmus* e de diversas espécies de *Spirulina*. Foram, igualmente, desenvolvidos outros estudos sobre a capacidade de remoção de nutrientes pela *Nannochloris*, *Botryococcus braunii*, e cianobactérias, nomeadamente, a *Phormidium bohneri*. No entanto, a *Chlorella vulgaris* é considerada como uma das melhores microalgas para a biorremediação de águas residuais, possuindo um potencial incrível para remover completamente azoto (ião amónio) e um bom potencial para eliminar o fósforo presente no meio (Mata *et al.*, 2010; Safi *et al.*, 2014).

O uso das microalgas seja para redução de emissões de  $\text{CO}_2$  ou para tratamento de águas residuais há formação de subprodutos. Estes subprodutos podem, também, ser utilizados para diversos fins nomeadamente para biocombustíveis.

Os biocombustíveis ganharam maior destaque devido ao aumento da dependência de recursos fósseis, em especial com o aumento exponencial da sua utilização, o que trouxe consequências dramáticas para o ambiente. Em termos de economia do carbono, o uso de microalgas para produção de biodiesel pode diminuir consideravelmente as emissões de  $\text{CO}_2$ , uma vez que a quantidade libertada durante a combustão é idêntica à que é fixada durante a fotossíntese e crescimento de plantas e algas. Contudo, a quantidade de  $\text{CO}_2$  depende do processo utilizado para a conversão de biomassa em biodiesel. De uma forma geral, quanto mais intensiva for a energia utilizada durante o processo, maiores serão as emissões de  $\text{CO}_2$ .



ao longo do ciclo de vida dos combustíveis, assumindo que esta energia provém de combustíveis fósseis (Mata *et al.*, 2010; Safi *et al.*, 2014).

Assim, a terceira geração de biocombustíveis utilizando microalgas é tida como uma alternativa às culturas utilizadas como matéria-prima para a produção dos biocombustíveis actuais, como a soja, milho, colza e matérias-primas lignocelulósicas. Na produção das microalgas não ocorre competição por alimentos nem há a exigência de solos férteis para o seu desenvolvimento. Para além destes factos, têm elevados teores de óleo e a produção de biomassa é extremamente rápida. Devido à sua constituição, estas podem ser transformadas em diversos produtos incluindo biodiesel através de transesterificação - substitutos de combustíveis verdes através da conversão directa catalítica hidrotérmica, bioetanol (via fermentação), metano (através da digestão anaeróbia), energia térmica (por combustão), e biocarvão e bio-óleo (através da conversão termoquímica). Na tabela 2.5 apresentam-se os teores de óleo, de diversas espécies de microalgas, que podem ser utilizados para a produção dos produtos indicados anteriormente (Safi *et al.*, 2014; Priyadarshani e Rath, 2012).

Tabela 2.5 - Teor de óleo presente em diversas microalgas.

| Microalgas                       | Teor de óleo (% peso seco) |
|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Botryococcus braunii</i>      | 25 – 75                    |
| <i>Chlorella sp.</i>             | 28 – 32                    |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i>     | 20                         |
| <i>Cylindrotheca sp.</i>         | 16 – 37                    |
| <i>Nitzschia sp.</i>             | 45 – 47                    |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 20 – 30                    |
| <i>Schizochytrium sp.</i>        | 50 – 77                    |
| <i>Tetraselmis suecia</i>        | 15 – 23                    |

(adaptado de Priyadarshani e Rath, 2012)

Como referido anteriormente, a biomassa resultante do tratamento de águas residuais com microalgas pode ser aplicada como fonte para a produção de biocombustíveis. Os benefícios económicos resultantes deste tipo de tratamento de águas residuais tornam esta

estratégia a mais rentável para o rápido desenvolvimento de processos de produção de biocombustíveis utilizando as microalgas. As águas residuais municipais apresentam várias vantagens no que diz respeito à sua utilização enquanto recurso na produção de biocombustíveis, nomeadamente:

- 1) São produzidas em quantidades e recolhidas num único local.
- 2) Contêm azoto ( $\approx 30 - 40 \text{ mg/l}$ ), fósforo ( $\approx 5 - 10 \text{ mg/l}$ ) e outros micronutrientes essenciais suficientes para a produção de grandes quantidades de biomassa.
- 3) Contém quantidades significativas de carbono necessárias para o crescimento das microalgas.
- 4) As microalgas removem essencialmente todos os nutrientes presentes no efluente, conseguindo-se deste modo alcançar um elevado grau de tratamento.
- 5) Existe retorno monetário para o processo de tratamento de águas residuais, que poderá ser muito superior ao valor dos combustíveis derivados da biomassa.
- 6) Os benefícios da redução dos gases de efeito de estufa são muito superiores aos que os biocombustíveis apresentam em separado, devido à redução do uso de energia em comparação com os processos convencionais de tratamento.
- 7) As lagoas com microalgas são já amplamente utilizadas no tratamento de águas residuais municipais, mesmo no caso de pequenos aglomerados populacionais. No entanto, para uma parte dos sistemas, o uso da tecnologia de lagoas de algas é familiar, visto já ser utilizada no tratamento de águas residuais industriais (Lundquist *et al.*, 2010).

A terceira geração de biocombustíveis a partir de microalgas é promissora a longo prazo, embora o seu custo de produção ainda seja considerado elevado para competir com os combustíveis convencionais. Mas compete favoravelmente em relação ao potencial de produção das culturas de microalgas ser entre 10 e 20 vezes maior que o do petróleo, para o mesmo intervalo de tempo. A *Chlorella vulgaris* tem a vantagem de acumular quantidades elevadas de lípidos, especialmente em condições de crescimento mixotróficas. Este facto tornou-a, também, adequada para a produção de biodiesel, apresentando uma estabilidade oxidativa após a transformação da biomassa em biodiesel. As suas propriedades estão de acordo com a norma dos EUA (ASTM 6751), a norma europeia (EN 14214), a Agência Nacional do Petróleo brasileira (ANP 255), com as normas australianas para o biodiesel e, também, está comparativamente favorável com as normas indianas para o biodiesel (ASTM e EN). Após a extracção de lípidos, os restantes resíduos são ricos em proteínas e hidratos de carbono e, ainda, possuem pequenas quantidades de lípidos. Estudos com a *Chlorella*

*vulgaris*, nomeadamente a aplicação de pirólise nestes resíduos através do uso de um reactor com pressão atmosférica de leito fluidizado fez com que se obtivesse bio-óleo e biocarvão, representando 94% de recuperação de energia a partir do remanescente, sem esquecer a pequena quantidade de biogás recuperado. No entanto, a qualidade do bio-óleo obtida foi fraca, devido à presença de azoto em quantidades significativas (12,8% de peso seco). Além disso, a *Chlorella vulgaris* tem um elevado teor de amido, que provou ser uma boa fonte para a produção de bioetanol. A extracção do amido e posterior conversão alcançou uma taxa de etanol de 65% depois de passar pelas fases de fermentação e sacarificação com leveduras. A liquefação hidrotermal é outra alternativa para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Esta envolve a reacção da biomassa em água a uma temperatura elevada com ou sem a presença de um catalisador para obtenção de um produto biológico bruto. A principal vantagem deste método é a melhoria em 10% a 15% do valor energético da *Chlorella vulgaris*, actuando sobre toda a biomassa, o que sugere que o óleo também deriva de hidratos de carbono e proteínas. Deste modo, não é necessário expôr as microalgas a condições de *stress* para aumentar os seus níveis de lípidos. Actualmente, este biocombustível apresenta inúmeras desvantagens, pondo em risco a sua comercialização à escala industrial devido ao elevado custo de produção, que está longe de ser competitivo com os combustíveis fósseis e, também, relativamente à sustentabilidade da sua produção. Diferentes estudos (Clarens *et al.*, 2010; Collet *et al.*, 2011; Jorquera *et al.*, 2010; Lam e Lee, 2012; Sander e Murthy, 2010; Singh e Olsen, 2011; Stephenson *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011) consideram a avaliação da análise de ciclo de vida uma ferramenta eficaz para identificar os motivos que levaram ao déficit de produção e explorar o seu impacto ambiental. Por conseguinte, chegou-se à conclusão de que os custos mais elevados têm origem nas infraestruturas, modo de produção, fertilizantes, colheita e processamento da biomassa, transporte, pegada de água, ruptura celular e no processo de extração de óleo. Assim, a produção de biocombustível precisa ainda de melhorias eficazes para a redução do consumo de energia, de forma a atingir preços competitivos com o petróleo no mercado. E, não menos importante, conseguir com que a sua produção global seja sustentável (Safi *et al.*, 2014).

### 2.3. Modos de produção

A produção de microalgas é efectuada com base no seu metabolismo e no melhor tipo de sistema, aberto ou fechado, a ela adequado. As microalgas são organismos que estão adaptados à presença de diversos compostos. Esta adaptação consiste na eliminação de compostos, armazenamento ou na sua utilização para benefício próprio. Geralmente, o desenvolvimento e crescimento destes organismos necessita de uma fonte de carbono e outra de luz para que ocorra fotossíntese. Contudo, conseguem ajustar-se a outras condições ou alterar a sua estrutura interna, como por exemplo, adaptarem-se bioquímica e fisiologicamente, embora externamente possam excretar uma variedade de compostos que permitem a disponibilidade de nutrientes ou limitar o crescimento de organismos competidores (Mata *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2014).

As microalgas podem assumir diferentes tipos de metabolismo como fotoautotrofia, heterotrofia, fotoheterotrofia e mixotrofia. A *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* são exemplos de espécies encontradas a crescer sob os diferentes tipos de metabolismo (Mata *et al.*, 2010).

A tabela 2.6 mostra as características de cada tipo de produção, nomeadamente, fontes de energia e carbono, densidade celular e desvantagens associadas a cada um.

Tabela 2.6 - Características de cada tipo de produção.

| Tipo de produção                           | Autofototrófica   | Heterotrófica                              | Mixotrófica  | Heterofototrófica  |
|--|---|--|--|--|
| Fonte de energia                           | Luz   | Orgânica                                   | Luz/Orgânica   | Luz  |
| Fonte de carbono                           | Inorgânico  | Orgânico                                   | Inorgânico/Orgânico  | Orgânico   |
| Densidade celular                          | Baixa   | Alta                                       | Média  | Média  |
| Tipo de reactor                            | Lagoas abertas/<br>Fotobiorreactor                      | Fermentador                                | Fotobiorreactor  | Fotobiorreactor  |
| Custo                                      | Baixo   | Médio                                      | Alto   | Alto   |
| Desvantagens associadas ao <i>scale-up</i> | Baixa densidade celular<br>Custo elevado de condensação | Contaminação<br>Custo elevado do substrato | Contaminação<br>Custo elevado dos equipamentos<br>Custo elevado do substrato | Contaminação<br>Custo elevado dos equipamentos<br>Custo elevado do substrato |

(adaptado de Chen *et al.*, 2011)

A fotoautotrofia consiste na utilização de luz como fonte de energia, como a luz solar, e carbono inorgânico como fonte de carbono com a finalidade de produzir energia química através da fotossíntese. Esta energia em conjunto com outros compostos que se encontram no meio pode originar polissacarídeos, proteínas, lípidos e glícidos (Chen *et al.*, 2011; Duarte, 2013).

Actualmente, a produção fotoautotrófica é o único método de produção de microalgas, cujo objectivo não é produzir energia viável, tanto a nível técnico como económico. Com este tipo de metabolismo, a produção dá-se em sistemas abertos bem como em fechados. No sistema aberto a tecnologia escolhida é, na maioria dos casos, as lagoas abertas ou *raceways*, enquanto em sistemas fechados opta-se pelos PBR's. A validade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas, bem como as condições climáticas, bem como os custos de espaço e água. Os requisitos mínimos para que haja crescimento incluem o teor de CO<sub>2</sub>, outros macro e micronutrientes, bem como a luz. Não obstante, o equilíbrio entre os parâmetros operacionais, como o oxigénio, CO<sub>2</sub>, pH, temperatura, intensidade da luz, produto e remoção do subproduto, é igualmente relevante para o desenvolvimento algal. O uso das condições naturais para a produção têm a vantagem de utilizar a luz solar como um recurso natural. No entanto, a utilização da luz solar tem uma disponibilidade definida pelos ciclos diurnos e variações sazonais, o que limita a viabilidade de produção comercial para áreas com alta radiação solar. Isto significa que o crescimento das microalgas é lento devido a limitações de luz com elevadas densidades celulares, ou à fotoinibição devido ao excesso de luz, especialmente em dias de muita intensidade solar. Nos sistemas abertos, a luz é geralmente o factor limitante. Para lidar com esta situação, podem ser implementados meios artificiais como lâmpadas fluorescentes. Deste modo, possibilita-se a produção em grande escala contínua, no entanto, como as fontes de energia são combustíveis fósseis, a pegada de carbono aumenta (Duarte, 2013; Brennan e Owende, 2010; Mata *et al.*, 2010).

Em heterotrofia as microalgas desenvolvem-se independentemente da energia luminosa, e a fonte de carbono é carbono orgânico. Este tipo de produção diminui os problemas associados à limitação de luz, característicos da produção fototrófica. O crescimento heterotrófico em fermentadores, proporciona um elevado controlo do processo, com menor custo e maior densidade de células. Algumas espécies de microalgas apresentam maior teor de lípidos durante o crescimento heterotrófico e podem assim, assimilar uma grande variedade de fontes de carbono orgânico, tais como a glucose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose, galactose, manose, e de crescimento. No caso da *Chlorella vulgaris*, as fontes de carbono utilizadas são a glucose, acetato, glicerol e o glutamato com uma taxa específica de crescimento máximo obtido

com glucose. No entanto, a grande desvantagem deste tipo de produção é o preço e a disponibilidade de açúcares que competem com matérias-primas para outros usos, como a produção de alimentos e biocombustíveis, e que sofre frequentemente de problemas de contaminação (Chen *et al.*, 2011; Duarte, 2013; Brennan e Owende, 2010; Safi *et al.*, 2014).

A produção mixotrófica é caracterizada pelo crescimento celular não depender apenas da fotossíntese, sendo que a energia da luz não é a única fonte de energia. A fonte de carbono não vem directamente do CO<sub>2</sub> nem do carbono contido no meio, uma vez que é possível usar compostos orgânicos ou inorgânicos como fonte. As taxas de crescimento das microalgas em culturas mixotróficas com sistemas de cultura abertos são muito inferiores às da produção heterotrófica. O sucesso da produção de microalgas mixotróficas possibilita a integração de componentes fotossintéticos e heterotróficos no ciclo diurno. Isto faz com que se reduza a perda de biomassa, na fase do ciclo escuro, diminui-se, também, a quantidade de substâncias orgânicas utilizadas para o crescimento. A cinética de crescimento das microalgas pode ser complexa se em vez de ser utilizada uma única espécie for utilizada uma mistura de espécies. O crescimento das microalgas implica a verificação de diversos factores, dos quais destacam uma fonte de carbono, uma fonte de azoto ou fósforo, uma fonte de luz, e micro e macronutrientes (Chen *et al.*, 2011; Duarte, 2013; Brennan e Owende, 2010).

No caso do fotoheterotrofismo as microalgas precisam de luz aquando do uso de compostos orgânicos para obtenção de carbono, o que é muito semelhante ao que acontece na produção mixotrófica. A sua distinção pode definir-se com base nas diferentes fontes de energia necessárias para que ocorra crescimento e produção de metabolitos específicos, em que a produção para ser heterofototrófica necessita, simultaneamente, de luz e açúcares (Chen *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2010).

De acordo com o objectivo da produção, as microalgas podem ser produzidas em sistema aberto ou fechado. Entende-se por sistema aberto a produção desenvolvida em contacto directo com o ambiente, estando sujeito às condições climáticas da zona ou região onde esta é desenvolvida, o que leva a um baixo controlo sobre determinados parâmetros essenciais para o desenvolvimento e crescimento de microalgas. No sistema fechado, este contacto directo não existe, o que torna possível o controlo quase total da produção. A figura 2.6 mostra os mecanismos utilizados em cada tipo de sistema.

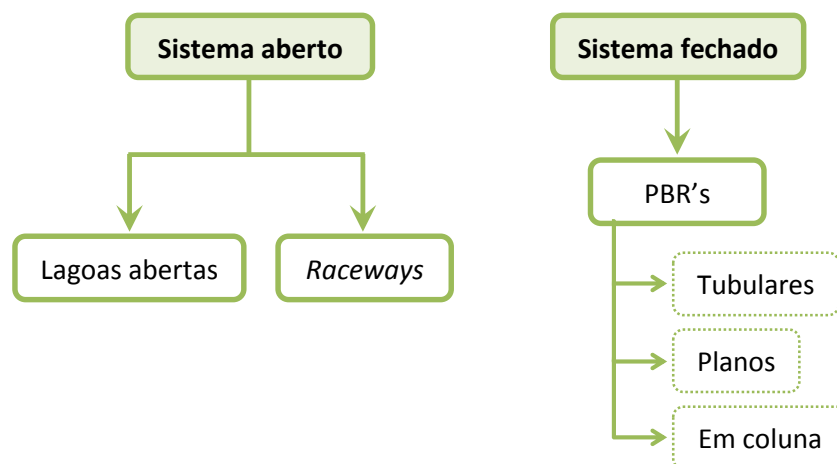


Figura 2.6 - Mecanismos utilizados em cada tipo de sistema.

Os mecanismos utilizados em sistemas abertos, lagoas abertas ou *raceways* são muito idênticos. A principal característica que os distingue é a movimentação da cultura, ou seja, nas lagoas as culturas encontram-se paradas e nos *raceways* estão em constante movimento. Ambos os mecanismos são susceptíveis às condições climáticas, não permitindo o controlo da temperatura da água, a evaporação e iluminação. No entanto, estes têm a capacidade de produzir grandes quantidades de biomassa implicando, para isso, uma extensa área de implantação. As lagoas abertas são a forma mais comum de produção e o método mais barato para a produção de biomassa em larga escala. Para que haja uma maior e mais fácil exposição de todas as células à radiação solar, em especial no final da fase de crescimento exponencial, a profundidade óptima de uma lagoa situa-se entre os 15cm e 50cm. Por outro lado, este mecanismo tem algumas limitações pois requerem um rigoroso controlo ambiental para evitar o risco da poluição, a evaporação da água, contaminantes, bactérias invasoras e o risco de crescimento de outras espécies de algas. Além disso, as diferenças de temperatura devido à mudança sazonal não podem ser controladas e tanto a concentração de CO<sub>2</sub> como a exposição excessiva à radiação solar é difícil de gerir. Outro aspecto negativo é o facto de, na fase final do crescimento exponencial, algumas células não estarem suficientemente expostas à luz solar devido a outras células se sobreporem. Tal facto provoca com que haja baixos rendimentos de produção de biomassa, havendo, por isso, agitação, que é um aspecto muito importante, tornando, assim, os *raceways* preferíveis às lagoas abertas. Os *raceways* (primeiro quadrante da figura 2.7) possuem um circuito fechado de mistura e circulação necessária para estabilizar o crescimento das microalgas e a sua produtividade, devendo a sua profundidade situar-se entre os 20cm e os 50cm. Apesar de, normalmente, as microalgas suprirem as suas necessidades de CO<sub>2</sub> com o CO<sub>2</sub> presente na atmosfera, podem ser aplicado um arejamento submerso para

melhorar a sua absorção (Lundquist *et al.*, 2010; Borowitzka, 1999; Brennan e Owende, 2010; Safi *et al.*, 2014).



Figura 2.7 – Raceway (imagem superior esquerda), PBR's planos (imagem superior direita), tubulares (imagem inferior esquerda) e em coluna (imagem inferior direita).

(Fonte: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Fotobiorreatores&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Fotobiorreatores&lang=3))

A produção de microalgas em sistema fechado foi desenvolvida para ultrapassar algumas das limitações associadas aos sistemas abertos. Por exemplo, os riscos de poluição e contaminação, na maioria dos casos, impedem o uso da biomassa produzida para a preparação de produtos de alto valor utilizados na indústria farmacêutica e cosmética. Este tipo de sistema também permite a produção de uma única espécie de microalgas, em períodos prolongados, com menor risco de contaminação. Aliás, os sistemas fechados são os que mais se adequam a espécies sensíveis que não podem competir e crescer em ambiente hostil. No entanto, as principais desvantagens são o custo da construção (que é sofisticada), pequena área de iluminação e os custos de esterilização (onde se incluem os gastos de água). Os reactores são feitos de materiais transparentes para que a captação de energia solar seja máxima e subdividem-se em três tipos: tubulares, planos e em coluna. Os PBR's tubulares apresentam as melhores condições para a produção de microalgas fotoautotróficas. Contudo, têm limitações ao nível do design, em particular, o comprimento dos tubos que é limitado pela acumulação de oxigénio, a depleção de CO<sub>2</sub> e as variações de pH, e este tipo de reactor não pode ser expandido indefinidamente. Relativamente aos PBR's planos, suportam maiores densidades de microalgas fotoautotróficas quando comparados aos PBR's tubulares, apresentam uma menor acumulação de oxigénio e maior eficiência fotossintética. Já os PBR's em coluna oferecem uma mistura mais eficiente, taxas de transferência de massa volumétrica mais elevadas e melhor controlo das condições de crescimento. O seu design é de baixo custo, compacto e fácil de operar. As colunas são colocadas verticalmente, arejadas a partir de baixo e iluminadas através das paredes transparentes, cuja fonte de luz pode também ser instalada internamente. A tabela 2.7 resume as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de sistemas descritos (Brennan e Owende, 2010; Eriksen, 2008; Jorquera *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013; Rosa, 2011; Safi *et al.*, 2014; Ugwu *et al.*, 2008).



Tabela 2.7 - Resumo das vantagens e limitações dos diferentes tipos de mecanismos de produção.

| Mecanismos de produção | Vantagens  | Limitações   |
|------------------------|--|--|
| <b>Raceway</b>         | Relativamente de baixo custo<br>Limpeza fácil<br>Utilização de terras não agrícolas<br>Baixo consumo de energia<br>Fácil manutenção  | Pobre produtividade de biomassa<br>Necessidade de extensas áreas<br>Limitação de espécies de microalgas<br>Baixa mistura, utilização de energia solar e CO <sub>2</sub><br>Risco elevado de contaminação |
| <b>PBR tubular</b>     | Grande área de superfície de iluminação<br>Indicado para produção exterior<br>Relativamente de baixo custo<br>Boa produtividade de biomassa  | Algum desenvolvimento de biofilme<br>Obstrução<br>Necessidade de espaços amplos<br>Gradientes de pH, oxigénio dissolvido e CO <sub>2</sub> ao longo dos tubos  |
| <b>PBR plano</b>       | Elevadas produtividades de biomassa<br>Esterilização fácil<br>Baixa acumulação de oxigénio<br>Boa transferência de luz<br>Grande área de superfície de iluminação<br>Indicado para produção exterior | Dificuldade em realizar <i>scale-up</i><br>Difícil controlo da temperatura<br>Baixo grau de <i>stress</i> hidrodinâmico<br>Algum desenvolvimento de biofilme   |
| <b>PBR em coluna</b>   | Compacto<br>Elevada transferência de massa<br>Baixo consumo de energia<br>Esterilização fácil<br>Reduzida fotoinibição e foto-oxidação   | Pequena área de iluminação<br>Custo elevado comparativamente aos <i>raceways</i><br>Construção sofisticada   |

(adaptado de Brennan e Owende, 2010)

## 2.4. Conceito de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria foi inspirado no conceito de uma refinaria de petróleo, e consiste numa plataforma que integra um processo com o objectivo de fraccionar os diversos compostos presentes na biomassa para a produção de vários produtos. Assim, a biorrefinaria consegue tirar proveito dos vários constituintes da biomassa, melhorando o valor proveniente de cada composto bem como, também, gerar a sua própria fonte de energia o que maximiza a sua rentabilidade e preserva o ambiente. Desta forma, a *Chlorella vulgaris* com todas as suas potencialidades e elevado teor em proteínas, hidratos de carbono, lípidos, pigmentos, minerais

e vitaminas, como já foi mencionado anteriormente, é merecedora de ser refinada. A figura 2.8 mostra a estrutura de uma biorrefinaria adequada à *Chlorella vulgaris*. Contudo, sem esquecer que cada unidade de operação deve ter em conta a próxima fase e preservar a integridade de todos os compostos de interesse no processo a jusante (Safi *et al.*, 2014).

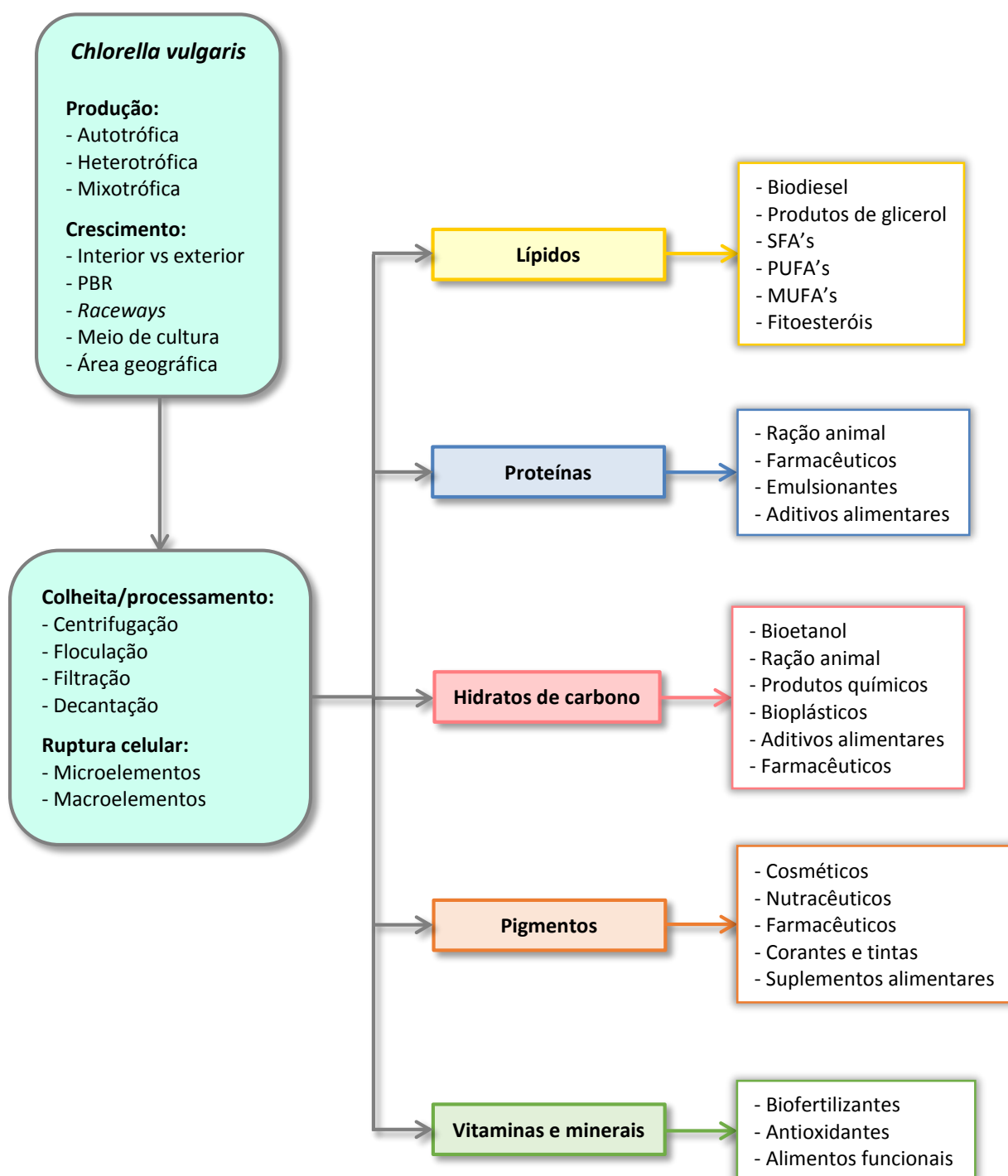


Figura 2.8 - Esquematização de uma possível biorrefinaria para *Chlorella vulgaris* (adaptado de Safi *et al.*, 2014).

### 3. CASO DE ESTUDO – ALGAFARM

#### 3.1. Enquadramento

A Unidade de Produção de Microalgas – Algafarm encontra-se localizada na vila de Pataias, pertencente ao distrito de Leiria.

A Algafarm é uma unidade que se destina à produção de microalgas com diversas aplicações. Estas passam pela alimentação humana e animal e pela indústria farmacêutica e cosmética. A produção é realizada em *scale up* em sistema fechado, recorrendo-se para tal a PBR's tubulares. Desta forma, é garantida a globalidade do processo de produção, desde a célula até à biomassa seca.

A estrutura da Algafarm teve como base os resultados obtidos numa unidade protótipo, de menores dimensões, que se encontra no mesmo local e em funcionamento desde 2009. A projecção da Algafarm resultou na implementação de 19 PBR's de produção de microalgas que constituem o sistema central da unidade. Destes 19 PBR's, cinco são do tamanho designado por "S", outros cinco do tamanho "M", oito do tamanho "L" e um "XL". As figuras 3.1 e 3.2 correspondem a fotos reais dos PBR's existentes na Unidade.



Figura 3.1 - Fotobiorreactores S e M da Algafarm.

(Fonte: <http://www.allma.com/pt/microalgas>)

Os diferentes tamanhos correspondem a diferentes capacidades, conforme se mostra na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Correspondência entre os tamanhos dos fotobiorreactores e a sua capacidade.

| Fotobiorreactores |                     |
|-------------------|---------------------|
| Tamanho           | Capacidade          |
| S                 | 10,5 m <sup>3</sup> |
| M                 | 37 m <sup>3</sup>   |
| L                 | 105 m <sup>3</sup>  |
| XL                | 180 m <sup>3</sup>  |

De um modo geral, as microalgas que se encontram em produção nos PBR's realizam a sua fotossíntese através da radiação solar, de nutrientes que são adicionados ao seu meio e de dióxido de carbono que é injectado. Desta forma, as microalgas conseguem transformar a energia que captam da radiação solar em energia química, que, por sua vez, ao reagir com o dióxido de carbono e com os restantes compostos, vão libertar oxigénio e diversos compostos orgânicos. Estes compostos derivam das suas reservas de energia, nomeadamente, de pigmentos, lípidos, proteínas, etc.



Figura 3.2 - Fotobiorreactores L da Algafarm.

(Fonte: <http://www.allma.com/pt/microalgas>)

### 3.2. Modo de produção

A Algafarm segue uma produção assente numa base de *scale up*, isto é, a produção inicia-se em laboratório com pequenos volumes que após se verificar o bom estado destas culturas de microalgas, passa-se para volumes de produção superiores. Tal ocorre gradualmente, passando dos balões de cinco litros, em laboratório, para sacos de 1000 litros, em estufa, e terminando nos PBR's, cuja capacidade vai variando consoante o tamanho de cada um. A figura 3.3 sistematiza o conceito de *scale up* utilizado pela Algafarm.

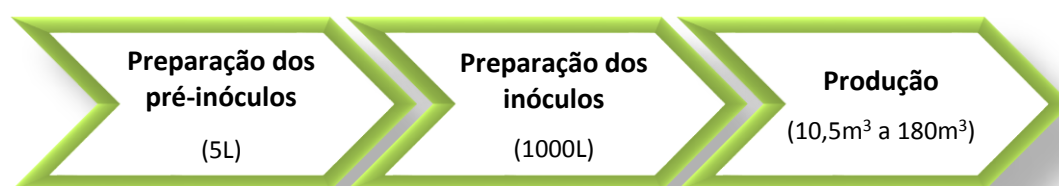


Figura 3.3 - Esquematização do *scale up* seguido pela Algafarm.

O primeiro passo da produção ocorre em laboratório, mais especificamente na sala de inóculos. Esta sala caracteriza-se por ser isolada do laboratório, de modo a permitir que o seu ambiente seja controlado e, assim, assegurar todas as condições necessárias para uma produção de qualidade. Nesta sala, são preparados os pré-inóculos que são a base de toda a produção. Todos os materiais envolvidos na produção de pré-inóculos, nomeadamente a água e nutrientes necessários para o desenvolvimento das microalgas, são previamente esterilizados de modo a prevenir, ao máximo, eventuais contaminações.

A fase seguinte consiste na produção dos inóculos que é igualmente efectuada num ambiente controlado, numa estufa. Nesta fase são preparadas umas mangas plásticas com capacidade de 1000 litros para receberem os pré-inóculos da fase anterior. Estes sacos são cheios com água e cloro de modo a garantir uma desinfecção eficaz para se evitar, mais uma vez, eventuais contaminações. Assim, com todas as condições necessárias, os sacos serão inoculados e darão origem aos chamados *greenwalls*.

De seguida, procede-se à produção efectiva de biomassa em PBR's. Estes encontram-se no exterior dos edifícios, a céu aberto, para que as microalgas em cultivo consigam captar a radiação solar. Quanto aos compostos necessários para o desenvolvimento e crescimento das culturas, nomeadamente o meio nutritivo, água e o dióxido de carbono, são adicionados de

forma automática. As culturas ficam em desenvolvimento até que estejam estabelecidas as condições para que passem à fase seguinte, isto é, à sua recolha e armazenamento.

Aquando da recolha da cultura, esta fica armazenada em depósitos de 60 m<sup>3</sup>, cujas condições se caracterizam pela ausência de luz e arejamento. Posteriormente, a cultura recolhida é concentrada através de um sistema de membranas desenvolvido especificamente para o efeito. O volume recolhido circulará tantas vezes neste sistema, quantas forem necessárias para se obter uma concentração final de cerca de 6% (p/v), ou seja, 60 gramas de biomassa seca por cada litro. Deste processo resulta a biomassa concentrada que será armazenada em depósitos sem luz e com arejamento até à fase seguinte.

A fase seguinte corresponde à secagem da biomassa concentrada. Para se realizar esta operação é necessária a utilização de equipamento específico, um *Spray Dryer* que é responsável pela secagem, por atomização de toda a biomassa. Consoante a biomassa que é seca, esta vai sendo armazenada em tremonhas para, posteriormente, ser embalada.

A última fase da produção consiste no embalamento do pó da biomassa obtida, em embalagens de 250gr, 5kg e 10kg. Após ser embalada, os sacos com biomassa são colocados em caixas de cartão, onde permanecerão armazenados até à sua venda e expedição.

É, ainda, importante referir que na fase de concentração de biomassa, o permeado que corresponde ao meio de cultura, é armazenado em depósitos, também estes com capacidade de 60m<sup>3</sup>, sem luz nem arejamento, para eventual recirculação.

Paralelamente a todo este processo de produção, é necessária a limpeza dos PBR's. Esta etapa é de extrema importância e é essencial para se garantir uma produção de qualidade. Quando a cultura de um PBR é colhida na totalidade, este tem de ser limpo para que possa receber uma nova cultura de microalgas. A limpeza é efectuada em várias etapas. O procedimento desta acção encontra-se descrito na figura 3.4.

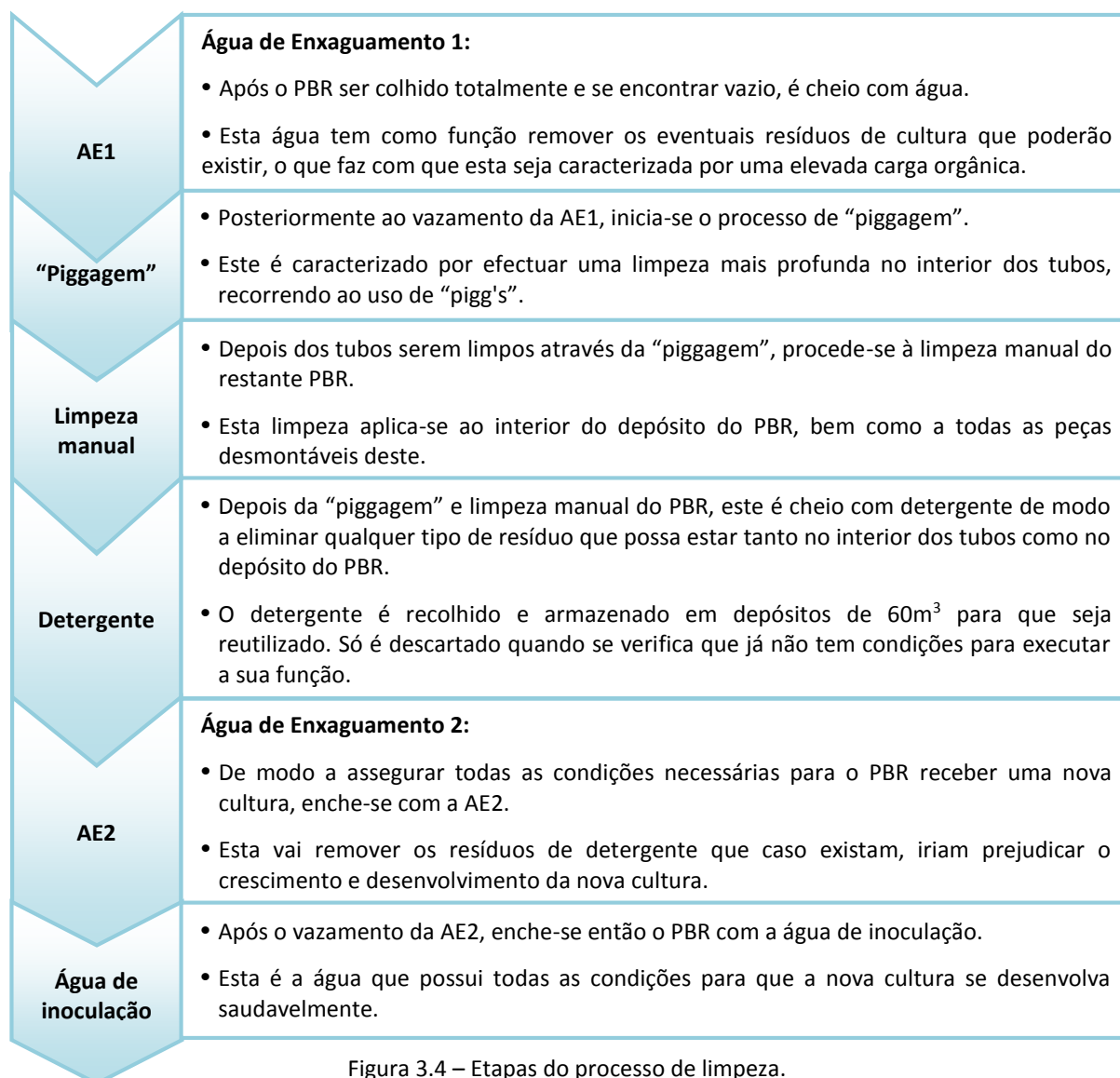


Figura 3.4 – Etapas do processo de limpeza.

A limpeza de alguns PBR's, nomeadamente, os de menor volume (S e M), geralmente, não há necessidade de levarem a primeira água de enxaguamento uma vez que a quantidade de resíduos não o justifica. Nestes casos, a limpeza começa com a piggagem do interior dos tubos e segue o procedimento normal. Outro facto importante é a origem de cada tipo de água de enxaguamento. Normalmente, estas são águas frescas (provenientes da pedreira da Cibra) mas, devido ao intervalo de tempo em que se procedeu a esta análise corresponder ao período de maior produção da Unidade, por vezes, os permeados foram reutilizados como AE1. Este procedimento deveu-se ao facto de não haver água fresca disponível e como a primeira água de enxaguamento serve apenas para retirar os resíduos de cultura, reutilizou-se o permeado para tal função. Considera-se que esta reutilização é já um passo para a gestão dos efluentes produzidos, uma vez que se poupa água fresca.

### **3.3. Normas de descarga de efluentes**

A descarga de efluentes industriais deverá respeitar determinadas normas que são, normalmente definidas pelos serviços municipais, ou pela (APA) Agência Portuguesa do Ambiente.

Posto isto, é importante referir que a Algafarm celebrou um contrato de drenagem de águas residuais com os Serviços Municipalizados da Câmara Municipal de Alcobaça. Este facto faz com que as normas de descargas que regem o efluente da Algafarm são as constantes no Anexo I do Artigo 51º do Regulamento nº 461 de 17 de Maio de 2010, Regulamento Municipal do Serviço de Distribuição de Água e na tabela 3.2, abaixo indicada, de forma resumida. Salienta-se que as ditas normas correspondem às descargas efectuadas para o colector municipal.



Tabela 3.2 - Normas de descarga dos Serviços Municipalizados de Alcobaça.

| <i>Parâmetros de controlo</i>          | <i>Valor máximo admissível</i> | <i>Unidades</i>                       |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>CBO<sub>5</sub> a 20°C</i>          | 500                            | mg O <sub>2</sub> /l                  |
| <i>CQO</i>                             | 1000                           | mg O <sub>2</sub> /l                  |
| <i>SST</i>                             | 1000                           | mg/l                                  |
| <i>pH</i>                              | 5,0<pH<9,0                     | Escala de Sörensen                    |
| <i>Temperatura</i>                     | <45                            | °C                                    |
| <i>Turvação</i>                        | 400                            | NTU                                   |
| <i>Óleos e Gorduras</i>                | 250                            | mg/l                                  |
| <i>Condutividade</i>                   | 3000                           | µS/cm                                 |
| <i>Cloretos totais</i>                 | 150                            | mg Cl/l                               |
| <i>Boro</i>                            | 1,0                            | mg B/l                                |
| <i>Arsénio total</i>                   | 0,5                            | mg As/l                               |
| <i>Chumbo total</i>                    | 0,5                            | mg Pb/l                               |
| <i>Cianetos totais</i>                 | 0,5                            | mg CN/l                               |
| <i>Cobre total</i>                     | 1,0                            | mg Cu/l                               |
| <i>Crómio hexavalente</i>              | 2,0                            | mg Cr (VI)/l                          |
| <i>Crómio trivalente</i>               | 2,0                            | mg Cr (III)/l                         |
| <i>Ferro total</i>                     | 2,5                            | mg Fe/l                               |
| <i>Níquel total</i>                    | 2,0                            | mg Ni/l                               |
| <i>Selénio total</i>                   | 0,05                           | mg Se/l                               |
| <i>Zinco total</i>                     | 5,0                            | mg Zn/l                               |
| <i>Mercúrio</i>                        | 0,05                           | mg Hg/l                               |
| <i>Prata</i>                           | 1,0                            | mg Ag/l                               |
| <i>Cádmio</i>                          | 0,2                            | mg Cd/l                               |
| <i>Metais Pesados (total)</i>          | 10                             | mg/l                                  |
| <i>Hidrocarbonetos totais</i>          | 50                             | mg/l                                  |
| <i>Cloro Residual disponível total</i> | 2,0                            | mg Cl <sub>2</sub> /l                 |
| <i>Fenóis</i>                          | 1,0                            | mg C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH/l |
| <i>Sulfuretos</i>                      | 2,0                            | mg S/l                                |
| <i>Azoto amoniacal</i>                 | 100                            | mg NH <sub>4</sub> /l                 |
| <i>Detergentes (lauril-sulfato)</i>    | 50                             | mg/l                                  |



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Tipos de análises e parâmetros

A caracterização dos efluentes é o ponto fulcral para efectuar um plano de gestão eficiente. Para tal, foi necessário analisar os efluentes em termos quantitativos, de modo a perceber os volumes descartados e a sua origem, mas também em termos qualitativos, para que se possa determinar a qualidade.

A análise quantitativa decorreu no período entre 8 de Maio e 8 de Setembro de 2014. Esta incidiu sobre a análise individual dos *reports* do depósito de efluentes produzidos automaticamente pelo sistema de automação, do registo manual do processamento e, ainda, das ordens de limpeza. Dos *reports* obtiveram-se os volumes descartados para o depósito de efluentes, que posteriormente foram vazados para o sistema municipal. No caso do processamento, a análise do registo permitiu averiguar a quantidade de água que é retirada das membranas, designada por permeado. No que diz respeito às ordens de limpeza foram avaliados os volumes envolvidos nesta etapa, bem como a verificação dos volumes de detergente que eram descartados por já não desempenharem, de modo eficiente, a sua função.

No que diz respeito à análise qualitativa, numa primeira fase foram analisados os *reports* referentes ao depósito de efluentes. Esta análise incidiu nos dados referentes ao pH, temperatura, condutividade e turvação, entre o período de 8 de Maio e 8 de Setembro de 2014. Tal permitiu identificar os sinais de alarme e avaliar se a descarga dos efluentes decorreu de acordo com as normas de descarga de acordo com a tabela 3.2. Numa segunda fase, foram definidos os fluxos que iriam ser alvo de análise, através da recolha de amostras. De seguida, foram seleccionados uma série de parâmetros a analisar em cada tipo de fluxo. Todos estes parâmetros encontram-se discriminados na tabela 4.1. Neste caso, esta análise possibilitou a determinação do potencial de reutilização de cada fluxo.

Tabela 4.1 - Identificação e descrição dos parâmetros seleccionados.

| Parâmetros                   | Descrição   |
|------------------------------|---|
| pH                           | Permite definir se o fluxo é ácido, neutro ou básico, o que é essencial para controlar a actividade biológica do fluxo.   |
| Condutividade                | Capacidade que um fluxo tem para conduzir a corrente eléctrica. Tal depende da presença de iões e da sua concentração total, bem como da sua mobilidade, valência e concentrações relativas, mas, também, da temperatura em que a medição da condutividade é efectuada. |
| Turvação                     | Corresponde à quantidade de matéria em suspensão, seja orgânica ou inorgânica.  |
| Azoto total                  | Contempla as principais formas de azoto: azoto orgânico, azoto amoniacal, nitratos e nitritos. Uma elevada concentração deste no meio leva à sua eutrofização.  |
| Cloretos                     | Iões inorgânicos que se encontram em grande concentração nas águas, em especial nas águas residuais. No entanto, uma elevada concentração deste irá prejudicar o crescimento e desenvolvimento de plantas.  |
| Detergentes (lauril-sulfato) | Refere-se nomeadamente à análise de surfactantes aniónicos, pois é o tipo de surfactantes mais frequente na formulação de detergentes de uso doméstico e industrial. Estes compostos são bio-acumuláveis.   |
| Fosfatos                     | Composto associado à eutrofização. Constitui um factor limitante primário para o crescimento de microalgas.   |
| Nitratos                     | Os nitratos são um composto azotado associado à eutrofização das águas. A sua concentração no meio deve ser controlada de modo a prevenir ou potenciar, consoante o objectivo pretendido, o crescimento de algas.   |
| SST                          | Matéria orgânica que se encontra suspensa nos fluxos.   |
| TOC                          | Corresponde às impurezas orgânicas presentes na amostra, dando a informação do nível de qualidade da água analisada.  |

(Santos *et al.*, 2008)

## **4.2. Análise quantitativa**

### **4.2.1. Reports automáticos**

Os *reports* analisados correspondem a *reports* diários que, previamente, foram programados para fornecer informação relativa ao depósito de efluentes. Esta informação permite através de médias horárias, durante as 24h, avaliar os dados de pH, temperatura, condutividade e turvação dos efluentes contidos no depósito. Foi ainda avaliada outro tipo de informação, nomeadamente, o número de vezes que as válvulas de entrada e saída abriram, ou ainda o nível a que se encontrava o depósito, informação essa que se encontra registada nos referidos *reports*. Cada *report* possui ainda a contagem do volume descartado, em cada hora, do referido dia, durante todos os dias do mês em questão. Tal como a contagem total do volume das descargas já efectuadas, denominada por contagem geral.

Quanto ao pH, temperatura, condutividade, turvação, nível do depósito e contagens de volume descartado, é ainda possível analisar os seus valores máximos, médios e mínimos, para um determinado dia.

Quanto às operações de abertura das válvulas de entrada e saída, foi registada a duração de cada abertura e quantas vezes ocorreu durante um dia.

Todos os parâmetros incluídos no *report* como foram medidos através de sondas, estas podem ter alguns erros e alarmes. Os alarmes de cada sonda, tal como a duração total destes, estão devidamente registados no *report*. O número de erros tal como a taxa de sucesso de cada sonda também se encontra registado.

A análise efectuada a estes *reports* incidiu sobre os volumes descartados, sendo contabilizados tanto por semana como por mês. Deste modo, foi possível obter um padrão de descargas que corresponde aos meses de maior produção. Ou seja, o pior cenário que a unidade poderá ter, em termos de volumes descartados.

### **4.2.2. Processamento**

A fase em que se processa o volume de cultura recolhido é caracterizada por um sistema de membranas, desenvolvido especialmente para esta função. Basicamente esta fase consiste na concentração do volume de cultura, em que é separada a biomassa, ou seja as microalgas, do seu meio de cultura.

Esta etapa da produção tem um registo manual, onde são registados todos os passos realizados bem como os volumes envolvidos em cada operação. A colheita de cultura não se processa de forma individual, ou seja, os volumes de cultura de diferentes PBR's são misturados no depósito, ao qual se destina a colheita. Estes volumes vão corresponder a um determinado número de processamento.

Para esta análise, apenas foram analisados os volumes colhidos e os volumes concentrados referentes a cada processamento, e não a cada PBR. A diferença entre estes dois volumes corresponde ao volume excedente após concentração. Este poderá ser reutilizado ou descartado.

#### 4.2.3. Ordens de limpeza

As ordens de limpeza consistem num registo manual do dia em que determinado PBR é colhido na totalidade, isto é, o dia em que se inicia a limpeza e todos os passos envolvidos nesta, bem como, o dia em que é inoculado com uma nova cultura.

A análise destas ordens focou-se essencialmente nos volumes despendidos em cada etapa da limpeza. Ou seja, quantificaram-se os volumes das águas de enxaguamento 1 e 2, do detergente descartado bem como das culturas que foram descartadas devido ao seu estado de degradação. Deste modo, conseguiu-se quantificar cada tipo de efluente descartado.

A figura 4.1 esquematiza este tipo de análise de uma forma sucinta.

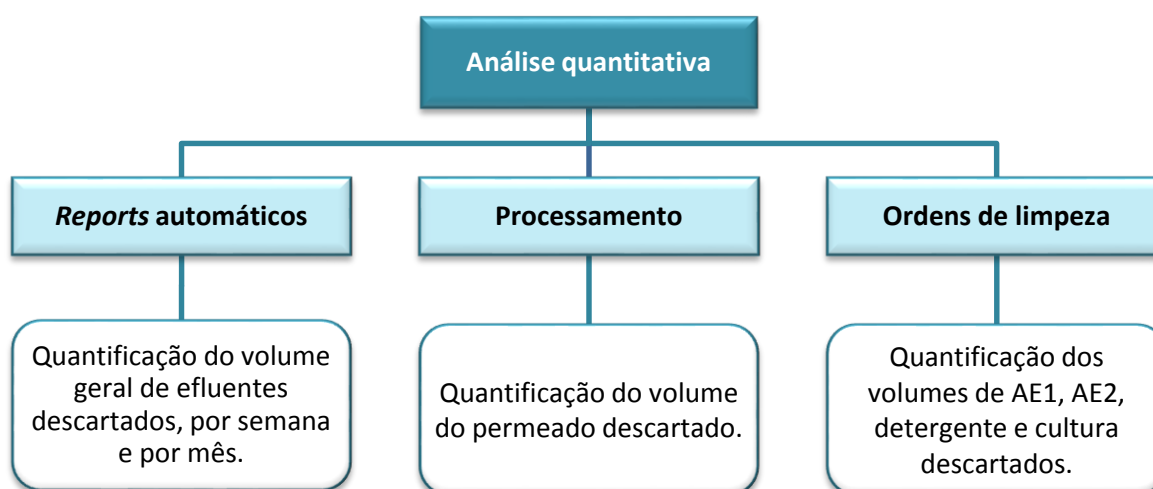


Figura 4.1 - Esquema da análise quantitativa.

### **4.3. Análise qualitativa**

A análise qualitativa está na base da caracterização de um determinado fluxo. Esta foi realizada através do estudo de diversos parâmetros físico-químicos, o qual possibilitou a avaliação e determinação da qualidade do fluxo estudado. Não obstante, estes fluxos para serem descarregados devem cumprir as normas de descarga pelas quais se regem e que já forma referidas anteriormente. Esta verificação foi efectuada através deste tipo de análise.

#### **4.3.1. Reports automáticos**

A análise dos *reports* do depósito de efluentes incidiu sobre os dados que se referem às médias diárias do pH, condutividade, temperatura e turvação, correspondente ao período entre 8 de Maio e 8 de Setembro de 2014. Estes dados foram traduzidos graficamente de modo a se obter um padrão de descarga para cada parâmetro. O padrão obtido foi comparado com as normas de descarga, verificando-se se este está de acordo, ou não, com as referidas normas.

#### **4.3.2. Análise dos fluxos**

Antes de se iniciar a análise, procedeu-se à definição dos fluxos que serão alvo deste tipo de análise. Os fluxos analisados provêm de diferentes origens, o que os torna distintos entre si, e cuja análise vai depender de parâmetros específicos. Assim sendo, os fluxos foram definidos da seguinte forma:

- ➔ Fluxo 1: águas de enxaguamento 1;
- ➔ Fluxo 2: águas de enxaguamento 2;
- ➔ Fluxo 3: permeado (água proveniente das membranas);
- ➔ Fluxo 4: detergente descartado.

##### **4.3.2.1. Plano de amostragem**

Posteriormente, elaborou-se um plano de amostragem cujo objectivo foi organizar a recolha de amostras de cada fluxo, bem como determinar os possíveis potenciais de reutilização. As amostras dos diversos fluxos foram recolhidas durante o período de 22 de Julho a 8 de Setembro de 2014.

Salienta-se o facto de o fluxo 4 ter sido alvo de análise apenas para se determinar as suas características enquanto efluente final, não tendo nenhum potencial de reutilização, sendo já reutilizado o máximo número de vezes possível e apenas ocorre o seu descarte quando não desempenha a sua função na íntegra.

O plano de amostragem encontra-se descrito na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Plano de amostragem.

| Fluxos | Plano de amostragem                                  | Frequência de análise   | Potencial de reutilização                     |
|--------|--|---|---|
| 1      | Recolher amostra antes do seu descarte               | Analisar semanalmente S's e M's em conjunto e L's em separado | Fertilizante/ Rega                            |
| 2      | Recolher amostra antes do seu descarte               | Analisar individualmente cada amostra                         | AE1/ Água de inoculação                       |
| 3      | Recolher amostra sempre que há um novo processamento | Analisar semanalmente, fazendo uma amostra composta           | AE1/ Fertilizante/ Rega/ Renovação de cultura |
| 4      | Recolher amostra antes do seu descarte               | Analisar individualmente cada amostra                         | -   |

#### 4.3.2.2. Preparação das amostras

As amostras foram recolhidas em garrafas de água vazias e previamente limpas e o volume recolhido variou entre os 500ml e 1500ml, tendo sido armazenadas e refrigeradas a uma temperatura de 4°C ao abrigo da luz. As condições do seu armazenamento foram essenciais para que não houvesse actividade microbiológica.

A preparação das amostras recolhidas foi realizada numa escala semanal, por tipo de fluxo. Ou seja, o período total foi dividido por semanas e trataram-se as amostras de cada tipo de fluxo correspondentes a cada uma dessas semanas. Nesta preparação, recorreu-se ao uso de provetas de 100ml, bem como, da *Multipette*, da EPPENDORF, para um maior rigor na medição dos volumes. As amostras preparadas foram acondicionadas igualmente em garrafas de plástico e, de seguida, foram congeladas a -20°C, de modo a garantir as condições de conservação necessárias. A contabilização das amostras recolhidas encontra-se descrita na tabela 4.3.



Tabela 4.3 - Número de amostras recolhidas em cada semana.

|         |             | Número de amostras recolhidas |         |         |         |
|---------|-------------|-------------------------------|---------|---------|---------|
|         |             | Fluxo 1                       | Fluxo 2 | Fluxo 3 | Fluxo 4 |
| Semanas | 22/7 a 28/7 | 4                             | 0       | 5       | 0       |
|         | 29/7 a 4/8  | 3                             | 3       | 9       | 0       |
|         | 5/8 a 11/8  | 1                             | 2       | 8       | 0       |
|         | 12/8 a 18/8 | 3                             | 1       | 11      | 0       |
|         | 19/8 a 25/8 | 0                             | 1       | 7       | 0       |
|         | 26/8 a 1/9  | 0                             | 0       | 7       | 2       |
|         | 2/9 a 8/9   | 1                             | 1       | 6       | 0       |

#### Fluxo 1 – Águas de Enxaguamento 1

As amostras referentes a este tipo de fluxo foram preparadas de acordo com a tabela 4.2. Contudo, alguns destes fluxos tiveram origem no permeado, ou seja, foi reutilizado o permeado das membranas como AE1. Deste modo, todos os fluxos do tipo 1 com origem no permeado foram analisados individualmente, independentemente do tamanho do PBR de onde eram provenientes.

No caso das amostras recolhidas de PBR's S e M, com origem em água fresca, foram analisadas em conjunto através da preparação de uma amostra composta. Por exemplo, na primeira semana de recolha teve de se preparar uma amostra composta de um S com um M. Para tal, teve de se ter em consideração a respectiva proporção:

$$\frac{S}{M} = \frac{10,5}{37} = 0,284$$

Sabendo que a amostra composta irá ter um volume de 500ml, teve de se determinar o volume a utilizar de cada amostra e para isso recorreu-se à razão entre um PBR S e M. Como um PBR  $S = 0,284M$ , o volume a utilizar da amostra do M foi de:

$$500 = 0,284x + x \Leftrightarrow 500 = 1,284x \Leftrightarrow x = 389,41ml$$

Do mesmo modo, obteve-se o volume a utilizar da amostra do PBR S:

$$S = 0,284M \Leftrightarrow S = 110,59 \text{ ml}$$

Relativamente às amostras recolhidas dos PBR's de tamanho L, foram analisadas individualmente, como já foi referido na tabela 4.2.

As amostras das semanas seguintes foram tratadas de igual forma, seguindo a mesma lógica.

#### Fluxo 2 – Águas de Enxaguamento 2

As amostras do fluxo 2 corresponderam a amostras das águas de enxaguamento 2 e a sua preparação e análise foi individual.

#### Fluxo 3 – Permeado

O fluxo 3 correspondeu às águas das membranas, denominado de permeado. Neste caso, as amostras relativas a este fluxo foram analisadas em conjunto, por semana. Como não existe diferença de dimensões a sua preparação foi elaborada através da média de amostras por semana. Por exemplo, na segunda semana foram recolhidas nove amostras tendo-se preparado uma amostra composta com um volume total de 500ml. Assim, fez-se a divisão do volume total que se pretendia obter pelo número de amostras e verificou-se que eram necessários 55,55ml de cada amostra recolhida do permeado.

Para as restantes semanas, o procedimento da preparação da amostra composta deste tipo de fluxo teve um procedimento idêntico.

#### Fluxo 4 – Detergente

As amostras do fluxo 4 foram preparadas e analisadas individualmente devido à natureza deste tipo de fluxo e objectivo.

A tabela 4.4 mostra o número de amostras, por semana, resultantes da preparação das amostras iniciais. Nesta tabela encontra-se ainda o código atribuído a cada amostra, alvo de análise, de forma a facilitar a sua designação quando referidas ao longo do presente trabalho.

Tabela 4.4 - Sistematização das amostras preparadas para análise e código correspondente.

| <i>Semanas</i> | <i>Amostras efectivas para análise</i> |                                     | <i>Código</i> |
|----------------|--|-------------------------------------|---------------|
|                |  |                                     |               |
|                | 22/7 a 28/7                            | Amostra composta do fluxo 1 (S+M)   | F1-1          |
|                |  | Amostra do fluxo 1 do M*            | F1-2          |
|                |  | Amostra do fluxo 1 do L             | F1-3          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-1          |
|                | 29/7 a 4/8                             | Amostra composta do fluxo 1 (L+L)   | F1-4          |
|                |  | Amostra do fluxo 1 do M*            | F1-5          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do M             | F2-1          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do M             | F2-2          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do M             | F2-3          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-2          |
|                | 5/8 a 11/8                             | Amostra do fluxo 1 do L             | F1-6          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do L*            | F2-4          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do L*            | F2-5          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-3          |
|                | 12/8 a 18/8                            | Amostra composta do fluxo 1 (S+S+M) | F1-7          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do L*            | F2-6          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-4          |
|                | 19/8 a 25/8                            | Amostra do fluxo 2 do M             | F2-7          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-5          |
|                | 26/8 a 1/9                             | Amostra composta do fluxo 3         | F3-6          |
|                |  | Amostra do fluxo 4 do S             | F4-1          |
|                |  | Amostra do fluxo 4 do M             | F4-2          |
|                | 2/9 a 8/9                              | Amostra do fluxo 1 do S*            | F1-8          |
|                |  | Amostra do fluxo 2 do M*            | F2-8          |
|                |  | Amostra composta do fluxo 3         | F3-7          |

\*Água proveniente das membranas (permeado).

As amostras tiveram de ser enviadas para um laboratório externo para a determinação de azoto total, detergentes e TOC, pois não foi possível realizar estas análises internamente.

A escolha do laboratório externo foi executada com base em determinados requisitos, nomeadamente:

- (i) ser um laboratório acreditado;
- (ii) volume de amostra exigida pelo laboratório para as determinações;
- (iii) menor custo por determinação e;
- (iv) prazo de entrega dos resultados.

Estando o laboratório escolhido, teve de se proceder à preparação das amostras para serem enviadas nas devidas condições para o laboratório. Após esta preparação, realizou-se o registo de cada amostra com um código específico que a empresa usa no caso de análises externas.

#### 4.3.2.3. Parâmetros analisados

Os diferentes tipos de fluxos foram caracterizados segundo determinados parâmetros. Estes não são comuns a todos os fluxos, devido à sua origem, e o seu possível potencial de reutilização. Deste modo, os parâmetros escolhidos para cada tipo de fluxo encontram-se descritos na tabela 4.5, onde são indicados os comuns e os específicos.

Tabela 4.5 - Parâmetros analisados em cada tipo de fluxo.

| <b>Fluxos</b> | <b>Parâmetros comuns</b>  | <b>Parâmetros específicos</b> |
|---------------|---|-------------------------------|
| 1             | pH, turvação,<br>condutividade, azoto<br>total, cloretos totais,<br>fosfatos, nitratos e<br>TOC | SST                           |
| 2             |   | Detergentes                   |
| 3             |   | -                             |
| 4             |   | Detergentes                   |

#### 4.3.2.4. Métodos

A análise dos parâmetros definidos na tabela 4.4 realizou-se segundo diferentes métodos. Na tabela 4.6 encontram-se os métodos utilizados para cada parâmetro, bem como se o parâmetro em questão foi analisado interna ou externamente. A descrição pormenorizada dos métodos encontra-se no anexo I.

Tabela 4.6 - Métodos adoptados para a análise dos diferentes parâmetros.

| Parâmetros                   | Análise | Métodos   |
|------------------------------|---------|---|
| pH                           | Interna | Método potenciométrico  |
| Condutividade                | Interna | Método potenciométrico  |
| Turvação                     | Interna | Método turbidimétrico   |
| Azoto total                  | Externa | Método realizado segundo EN 12260                             |
| Cloretos totais              | Interna | Método do nitrato de mercúrico                                |
| Detergentes (lauril-sulfato) | Externa | Método espectrofotométrico realizado segundo o SMEWW 5540 C   |
| Fosfatos                     | Interna | Método espectrofotométrico                                    |
| Nitratos                     | Interna | Método espectrofotométrico                                    |
| SST                          | Interna | Método gravimétrico   |
| TOC                          | Externa | Método realizado de acordo com EN 1484, EN 13370 e SMEWW 5310 |

É importante referir que a maior parte das análises realizadas internamente já eram efectuadas no laboratório da Algafarm. No caso da análise aos cloretos totais foi implementado no decurso deste trabalho. Todo este processo encontra-se também descrito no anexo I em conjunto com a descrição do método. Os SST embora não fossem determinados internamente, havia todo o material necessário para a fazer. O método utilizado apenas sofreu uma adaptação consoante os materiais existentes no laboratório, procedimento esse também descrito no anexo I. O mesmo se sucedeu com a análise da turvação, cujo método e adaptação se encontra no anexo I.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise quantitativa

#### 5.1.1. Reports automáticos

Após a análise dos *reports* produzidos, no período entre 8 de Maio e 8 de Setembro, verificou-se que o volume de efluentes descarregados foi de 6.415,90 m<sup>3</sup>. A figura 5.1 mostra os volumes descarregados em cada semana do período estipulado.

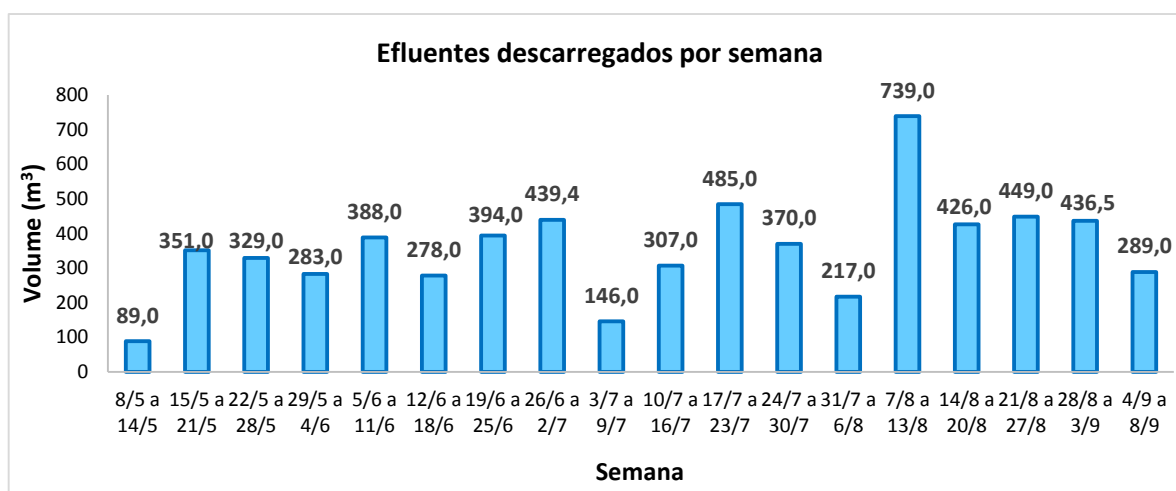


Figura 5.1 - Volume de efluentes descarregados por semana.

A figura 5.2 mostra os mesmos volumes descarregados, mas em cada mês, do mesmo período. Desta forma, consegue-se ter uma melhor percepção dos meses de maior produção e consecutivamente, os que mais efluentes produzem.

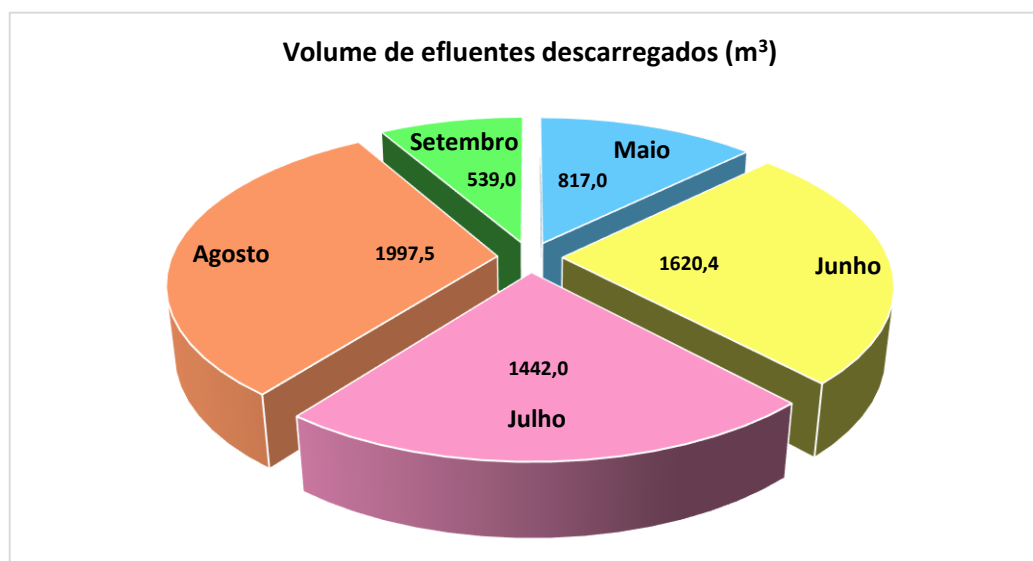


Figura 5.2 - Volume de efluentes descarregados em cada mês.

### 5.1.2. Processamento

Os resultados obtidos da análise dos volumes dos efluentes produzidos nesta etapa da produção encontram-se tabela 5.1, abaixo indicada.

Tabela 5.1 - Volumes envolvidos na fase do processamento.

|                 | <b>Volume total<br/>de cultura (m<sup>3</sup>)</b> | <b>Volume total<br/>concentrado (m<sup>3</sup>)</b> | <b>Volume total<br/>excedente (m<sup>3</sup>)</b> | <b>% de Volume<br/>total excedente</b> |
|-----------------|--|---|---|--|
| <b>Maio</b>     | 1746,5   | 78,4  | 1668,1  | <b>95,5</b>                            |
| <b>Junho</b>    | 2508,0   | 90,3  | 2417,7  | <b>96,4</b>                            |
| <b>Julho</b>    | 2711,6   | 99,5  | 2612,1  | <b>96,3</b>                            |
| <b>Agosto</b>   | 1229,5   | 45,2  | 1184,3  | <b>96,3</b>                            |
| <b>Setembro</b> | 2652,0   | 54,0  | 2598,0  | <b>98,0</b>                            |
| <b>Total</b>    | <b>10847,6</b>                                     | <b>367,3</b>  | <b>10480,3</b>                                    | <b>96,5</b>                            |

Como se pode verificar pela análise da tabela 5.1, grande parte do volume de cultura colhida é excedentário, isto é, no processo de concentração da biomassa, em média, cerca de 96,5% do volume total de cultura colhido corresponde a volume excedente. Este volume corresponde ao meio de desenvolvimento da cultura que é composto por água e meio nutritivo e que, através do sistema de membranas, é separado da cultura que posteriormente vai ser seca no *Spray Dryer*. Visto não ser aproveitado para o processamento da biomassa é considerado um volume excedentário. Durante o período de estudo, este volume correspondeu a cerca de 10.480 m<sup>3</sup>. Parte deste volume foi reutilizado e o restante foi descartado.

### 5.1.3. Ordens de limpeza

Após se ter realizado uma análise detalhada às ordens de limpeza, onde foram contabilizados todos os volumes envolvidos e descartados nesta operação, verificou-se que estes volumes incluem, não só os volumes de água de enxaguamento descartados, mas também os volumes de cultura e detergente descartados.

Na tabela 5.2 resumem-se todos estes volumes gastos por tipo de PBR, em cada mês, conseguindo-se, também, desta forma, ter a percepção, tanto dos volumes descartados em



cada tipo de PBR durante o período de análise, como, também, dos volumes descartados em cada mês do intervalo de tempo em que decorreu o estudo.

Tabela 5.2 – Efluentes gerados durante a operação de limpeza de cada tipo de PBR.

|                 | <i>Efluentes<br/>produzidos pela<br/>limpeza de PBR's<br/>S (m³)</i> | <i>Efluentes<br/>produzidos pela<br/>limpeza de PBR's<br/>M (m³)</i> | <i>Efluentes<br/>produzidos pela<br/>limpeza de PBR's<br/>L (m³)</i> | <i>Efluentes<br/>produzidos pela<br/>limpeza do PBR<br/>XL (m³)</i> | <i>TOTAL<br/>(m³)</i> |
|-----------------|--|--|--|---|-----------------------|
| <b>Maio</b>     | 73,5   | 185  | 185  | 340   | <b>783,5</b>          |
| <b>Junho</b>    | 105  | 259  | 1265   | 0   | <b>1629</b>           |
| <b>Julho</b>    | 117,5  | 444  | 830  | 170   | <b>1561,5</b>         |
| <b>Agosto</b>   | 105  | 333  | 800  | 170   | <b>1408</b>           |
| <b>Setembro</b> | 21   | 74,0   | 285  | 50  | <b>430</b>            |
| <b>TOTAL</b>    | <b>422</b>   | <b>1295</b>  | <b>3365</b>  | <b>730</b>  | <b>5812</b>           |

Na figura 5.3 mostram-se os volumes de efluentes produzidos em cada mês do período de análise.

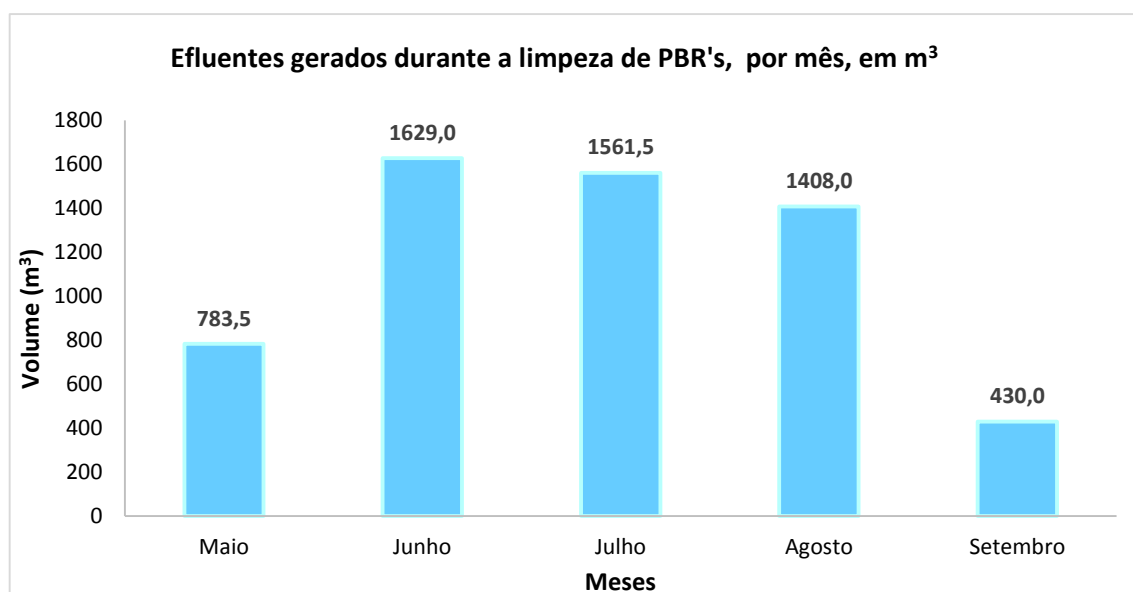


Figura 5.3 - Efluentes gerados pela limpeza dos PBR's, por mês.

Os efluentes produzidos são constituídos por diversos tipos de fluxos, cuja constituição se encontra mostra na figura 5.4.

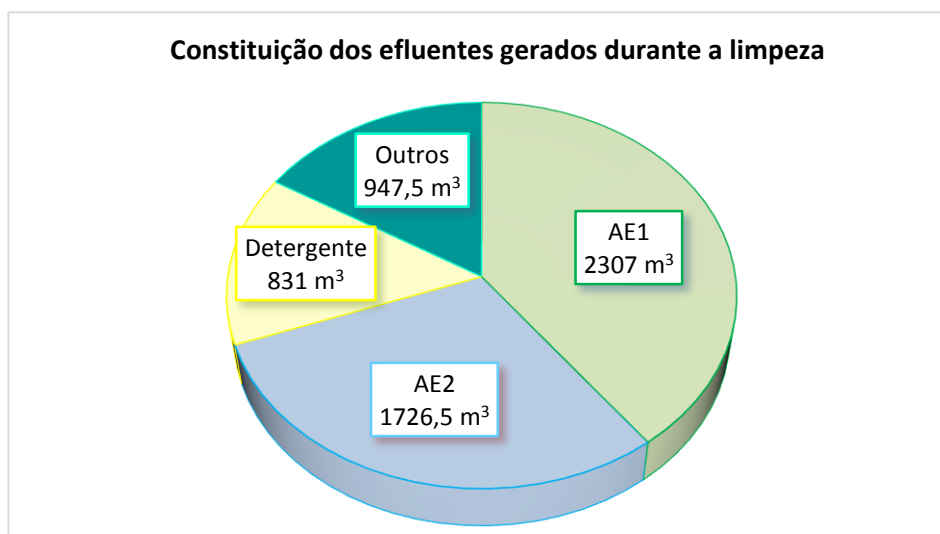


Figura 5.4 - Constituição dos efluentes produzidos durante a limpeza.

Com base nos dados analisados anteriormente, analisou-se a percentagem correspondente a cada efluente, por mês - figura 5.5.

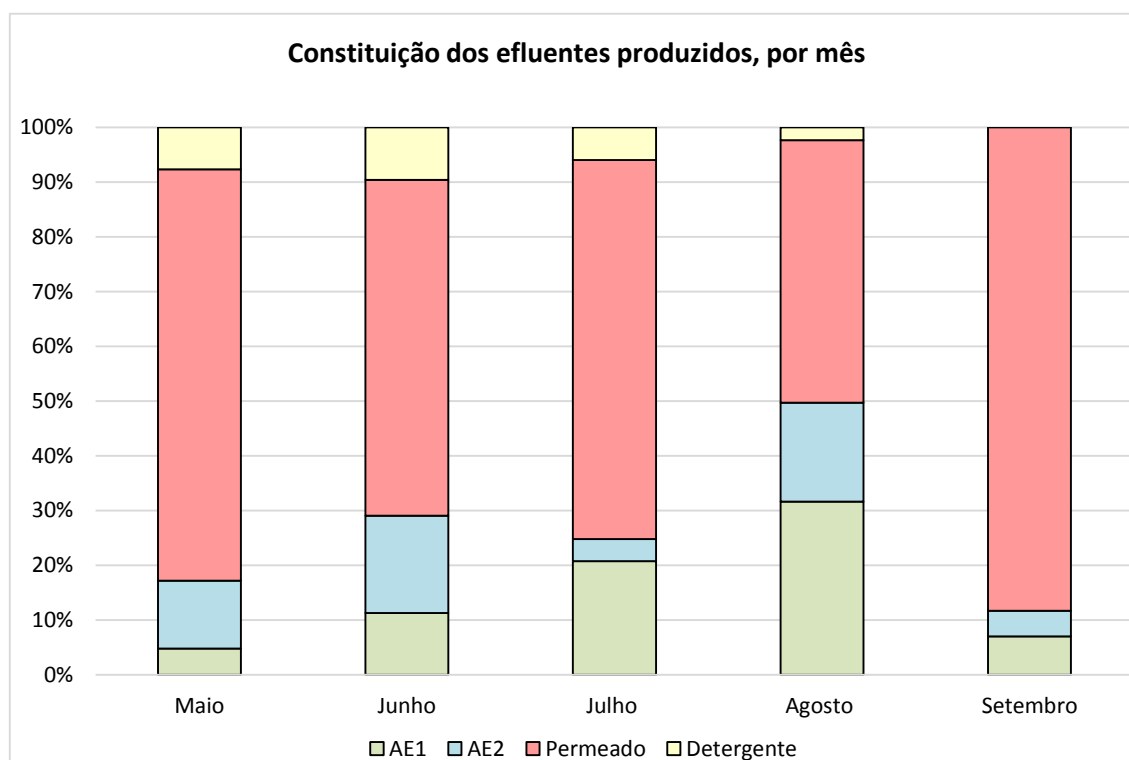


Figura 5.5 - Constituição dos efluentes produzidos, por mês.

## 5.2. Análise qualitativa

### 5.2.1. Reports automáticos

Os dados dos *reports* analisados corresponderam aos dados de pH, temperatura, condutividade e turvação. Com os dados referentes a cada parâmetro, construíram-se gráficos que permitiram uma visualização do padrão de cada um dos parâmetros.

A figura 5.6 corresponde aos valores médios de pH registados pela sonda do depósito, deste 8 de Maio a 8 de Setembro. Através desta figura foi possível avaliar a evolução, ao longo do tempo, e compara-los com os valores da norma de descarga.

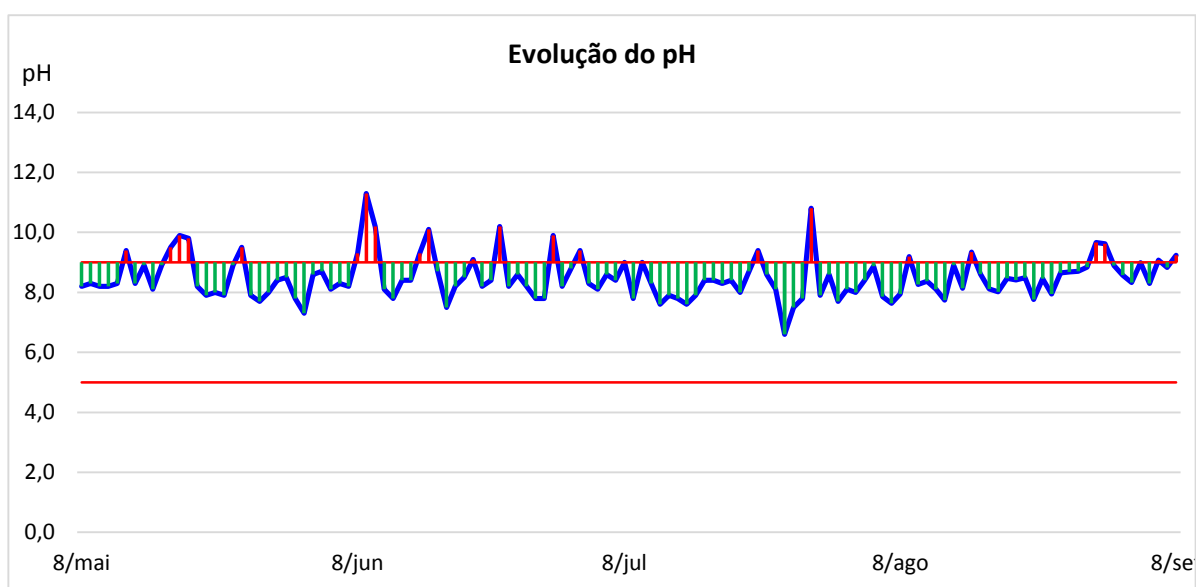


Figura 5.6 - Evolução do pH.

A figura 5.7 corresponde aos valores médios de temperatura registados durante o mesmo período. Deste modo, mostra-se a sua evolução, tendo por base a concordância com a norma de descarga respectiva.

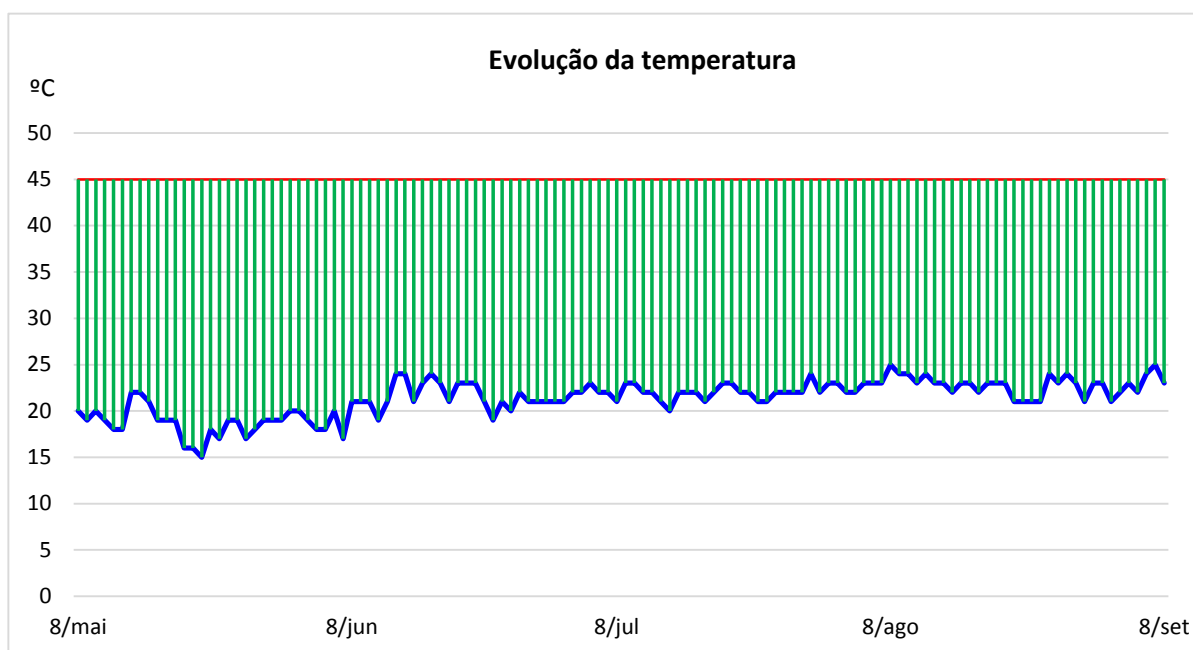


Figura 5.7 - Evolução da temperatura.

Relativamente à condutividade e turvação, a sua evolução encontra-se representada nas figuras 5.8 e 5.9, respectivamente. Os dados correspondem a valores médios diários registados nos *reports*.

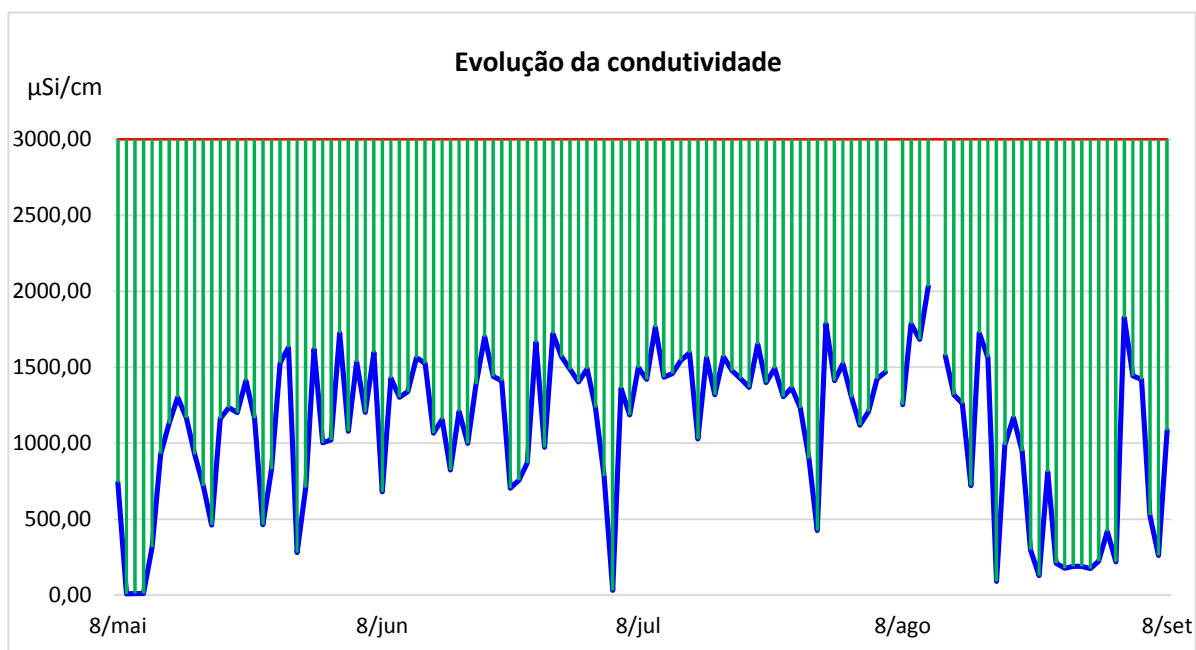


Figura 5.8 - Evolução da condutividade.

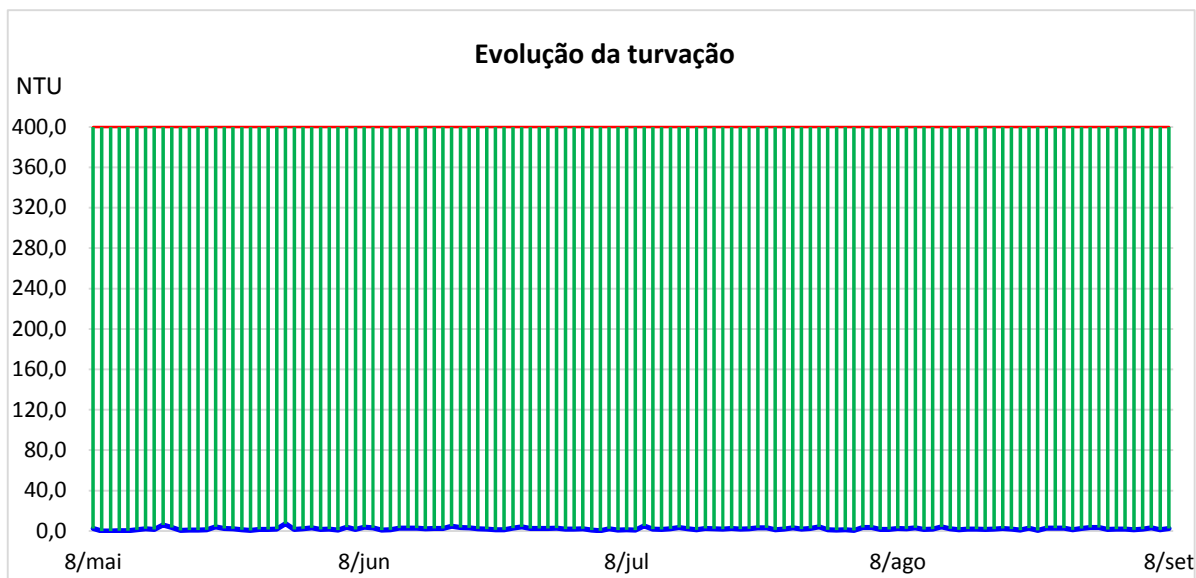


Figura 5.9 - Evolução da turvação.

### 5.2.2. Análise dos fluxos

A análise aos fluxos definidos previamente foi realizada separadamente, ou seja, por tipo de fluxo. Assim, as tabelas 5.3 a 5.6 mostram-se os resultados obtidos para todas as amostras dos fluxos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As amostras analisadas estão representadas pelo código que lhe foi atribuído e referido na tabela 4.3.

Tabela 5.3 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 1 (água de enxaguamento 1).

|  | <b>F1-1</b> | <b>F1-2</b> | <b>F1-3</b> | <b>F1-4</b> | <b>F1-5</b> | <b>F1-6</b> | <b>F1-7</b> | <b>F1-8</b> |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>pH</b><br>(Escala de Sörensen)                    | 7,61        | 7,40        | 7,25        | 8,57        | 7,67        | 7,98        | 7,57        | 7,98        |
| <b>Turvação</b><br>(NTU)                             | 82,40       | 149,70      | 156,20      | 80,40       | 70,80       | 198,80      | 158,40      | 59,50       |
| <b>Condutividade</b><br>( $\mu\text{Si}/\text{cm}$ ) | 1,42        | 1,92        | 2,20        | 1,65        | 1,91        | 2,65        | 1,64        | 5,27        |
| <b>Azoto total</b><br>(mg/l N)                       | 31,40       | 50,10       | 52,80       | 45,80       | 58,10       | 12,50       | 47,30       | 39,20       |
| <b>Cloretos totais</b><br>(mg/l Cl)                  | 51,00       | 52,00       | 60,50       | 52,50       | 53,50       | 70,00       | 94,50       | 75,00       |
| <b>Fosfatos</b><br>(mg/l $\text{PO}_4$ )             | 1,89        | 0,94        | 7,96        | 3,62        | 1,91        | 8,17        | 17,96       | 82,11       |
| <b>Nitratos</b><br>(mg/l $\text{NO}_3$ )             | 6,07        | 2,79        | 3,40        | 0,81        | 0,81        | 9,95        | 159,38      | 217,18      |
| <b>SST</b><br>(mg/l)                                 | 0,313       | 0,087       | 0,333       | 0,360       | 0,207       | 0,193       | 0,420       | 0,220       |
| <b>TOC</b><br>(mg/l)                                 | 33,70       | 20,30       | 48,60       | 27,40       | 12,70       | 80,80       | 29,60       | 43,80       |

Tabela 5.4 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 2 (água de enxaguamento 2).

|   | <b>F2-1</b> | <b>F2-2</b> | <b>F2-3</b> | <b>F2-4</b> | <b>F2-5</b> | <b>F2-6</b> | <b>F2-7</b> | <b>F2-8</b> |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>pH</b><br>(Escala de Sørensen)                       | 7,86        | 8,37        | 8,91        | 8,22        | 8,46        | 8,26        | 8,06        | 8,13        |
| <b>Turvação</b><br>(NTU)                                | 5,30        | 13,40       | 10,20       | 27,90       | 65,80       | 21,70       | 26,40       | 12,30       |
| <b>Condutividade</b><br>( $\mu\text{Si}/\text{cm}$ )    | 0,63        | 0,66        | 0,70        | 3,41        | 1,84        | 2,17        | 2,78        | 4,28        |
| <b>Azoto total</b><br>(mg/l N)                          | 1,96        | 3,36        | 2,80        | 27,10       | 54,20       | 5,59        | 8,43        | 27,00       |
| <b>Cloretos totais</b><br>(mg/l Cl <sup>-</sup> )       | 55,00       | 64,00       | 70,00       | 105,00      | 92,50       | 90,00       | 125,00      | 94,00       |
| <b>Detergentes</b><br>(mg/l)                            | <0,020      | 0,021       | 0,026       | 0,216       | 0,192       | 0,121       | 0,085       | 0,345       |
| <b>Fosfatos</b><br>(mg/l PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) | 0,98        | 0,06        | 0,24        | 1,69        | 1,14        | 3,13        | 3,52        | 30,69       |
| <b>Nitratos</b><br>(mg/l NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | 4,60        | 3,91        | 4,78        | 20,30       | 6,42        | 12,19       | 13,31       | 17,02       |
| <b>TOC</b><br>(mg/l)                                    | 4,16        | 8,95        | 6,24        | 212,00      | 29,40       | 110,00      | 112,00      | 249,00      |

Tabela 5.5 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 3 (permeado).

|   | <b>F3-1</b> | <b>F3-2</b> | <b>F3-3</b> | <b>F3-4</b> | <b>F3-5</b> | <b>F3-6</b> | <b>F3-7</b> |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>pH</b><br>(Escala de Sørensen)                       | 8,66        | 8,05        | 7,86        | 7,69        | 7,61        | 7,69        | 7,66        |
| <b>Turvação</b><br>(NTU)                                | 19,60       | 15,70       | 25,60       | 14,70       | 12,20       | 10,30       | 11,20       |
| <b>Condutividade</b><br>( $\mu\text{Si}/\text{cm}$ )    | 1,96        | 2,00        | 2,01        | 3,26        | 3,90        | 3,89        | 5,80        |
| <b>Azoto total</b><br>(mg/l N)                          | 46,70       | 0,41        | 27,60       | 9,61        | 10,50       | 6,61        | 7,89        |
| <b>Cloretos totais</b><br>(mg/l Cl <sup>-</sup> )       | 54,00       | 53,00       | 73,00       | 86,50       | 110,00      | 110,00      | 95,00       |
| <b>Fosfatos</b><br>(mg/l PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) | 1,32        | 1,40        | 0,48        | 9,51        | 12,82       | 17,80       | 0,00        |
| <b>Nitrato</b><br>(mg/l NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )  | 4,78        | 5,64        | 16,59       | 22,63       | 19,61       | 25,30       | 38,32       |
| <b>TOC</b><br>(mg/l)                                    | 16,60       | 3,59        | 157,00      | 286,00      | 191,00      | 153,00      | 241,00      |

Tabela 5.6 - Resultados das análises efectuadas às amostras do fluxo 4 (detergente).

|   | <b>F4-1</b> | <b>F4-2</b> |
|---|-------------|-------------|
| <b>pH</b><br>(Escala de Sörensen)                       | 10,02       | 10,48       |
| <b>Turvação</b><br>(NTU)                                | 68,40       | 67,20       |
| <b>Condutividade</b><br>( $\mu\text{Si}/\text{cm}$ )    | 2,44        | 3,10        |
| <b>Azoto total</b><br>(mg/l N)                          | 16,90       | 47,00       |
| <b>Cloretos totais</b><br>(mg/l Cl <sup>-</sup> )       | 210,00      | 240,00      |
| <b>Detergentes</b><br>(mg/l)                            | 0,213       | 0,200       |
| <b>Fosfatos</b><br>(mg/l PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) | 3,98        | 6,65        |
| <b>Nitratos</b><br>(mg/l NO <sub>3</sub> )              | 13,05       | 87,38       |
| <b>TOC</b><br>(mg/l)                                    | 69,90       | 219,00      |

Os resultados obtidos foram comparados com a legislação em vigor, de modo a ser possível inferir sobre o seu potencial de reutilização, caso este se verifique. Todos os fluxos foram analisados de acordo com as normas de descargas (tabela 3.2). Sempre que possível, foi ainda avaliado o potencial de reutilização dos fluxos 1, 2 e 3 com base nos parâmetros do Anexo XVI do Decreto-Lei nº 236 de 1 de Agosto de 1998, referente à qualidade das águas destinadas a rega.

A comparação com as normas de descarga para os parâmetros pH, turvação, condutividade, cloretos totais, detergentes e SST está representada nas figuras 5.10 a 5.15, respectivamente.

No caso da avaliação do potencial de reutilização dos fluxos 1, 2 e 3, com base no anexo XVI do Decreto-Lei nº 236/98 referente a águas para rega, esta incidiu sobre os parâmetros de pH, cloretos totais, nitratos e SST. Os resultados para cada parâmetro mostram-se nas figuras 5.16 a 5.19, respectivamente.

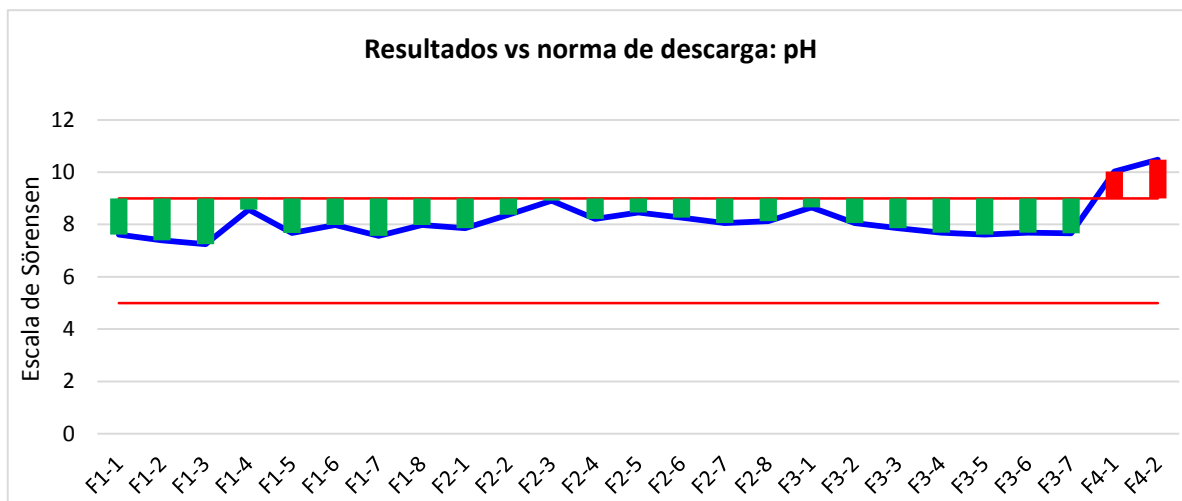


Figura 5.10 - Resultados vs norma de descarga: pH.

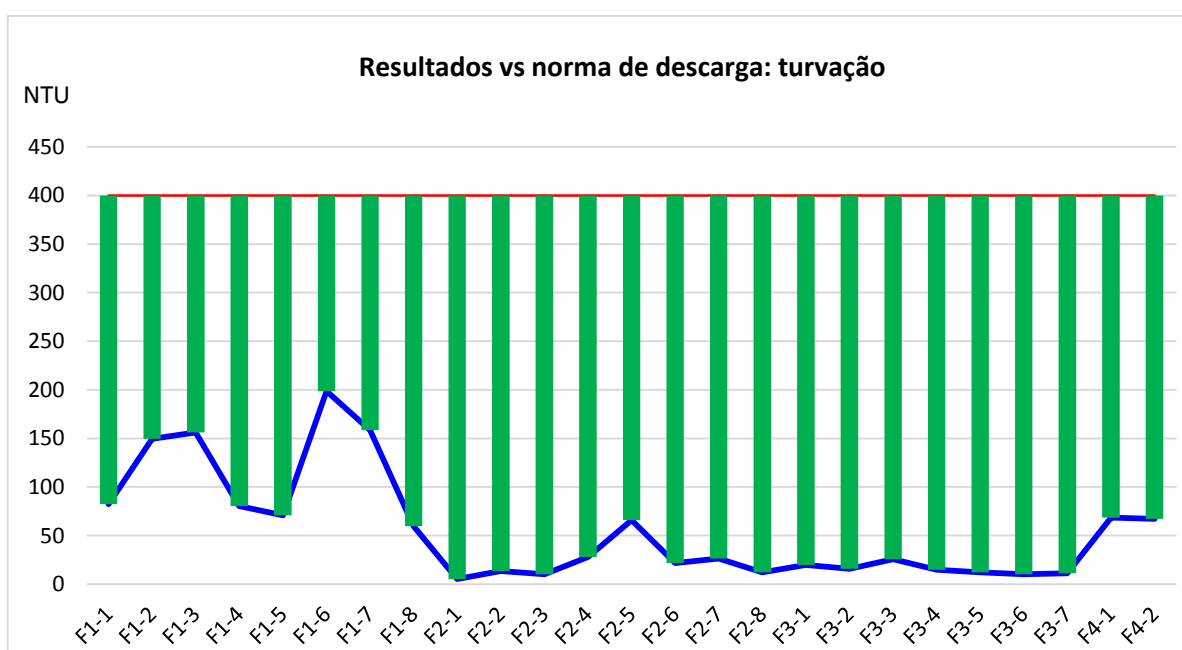


Figura 5.11 - Resultados vs norma de descarga: turvação.



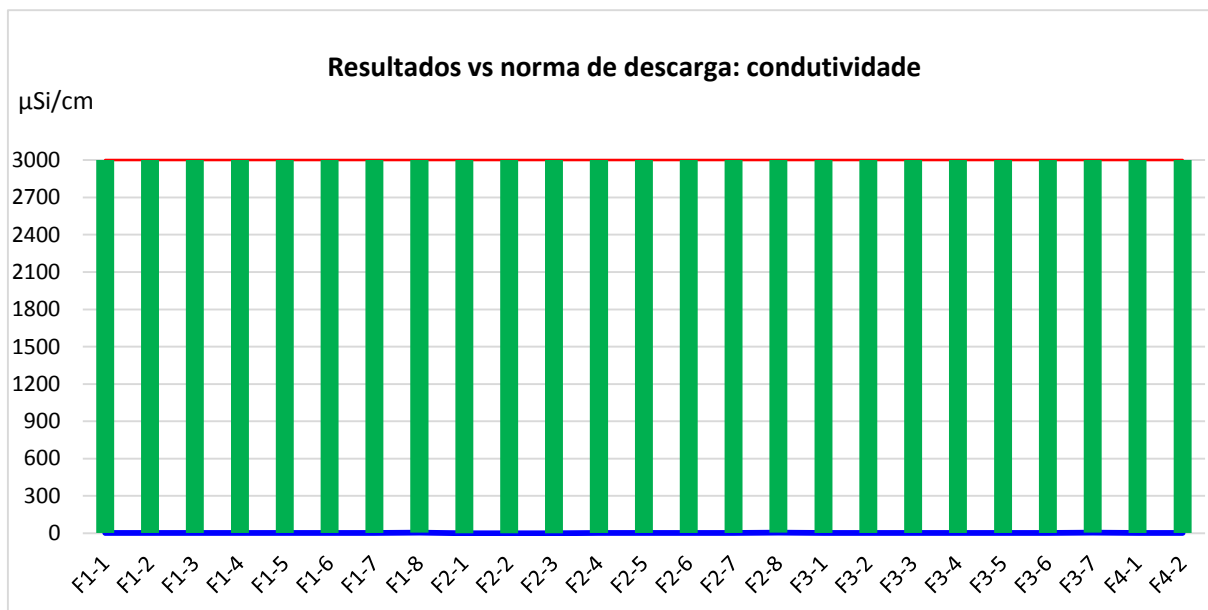


Figura 5.12 - Resultados vs norma de descarga: condutividade.

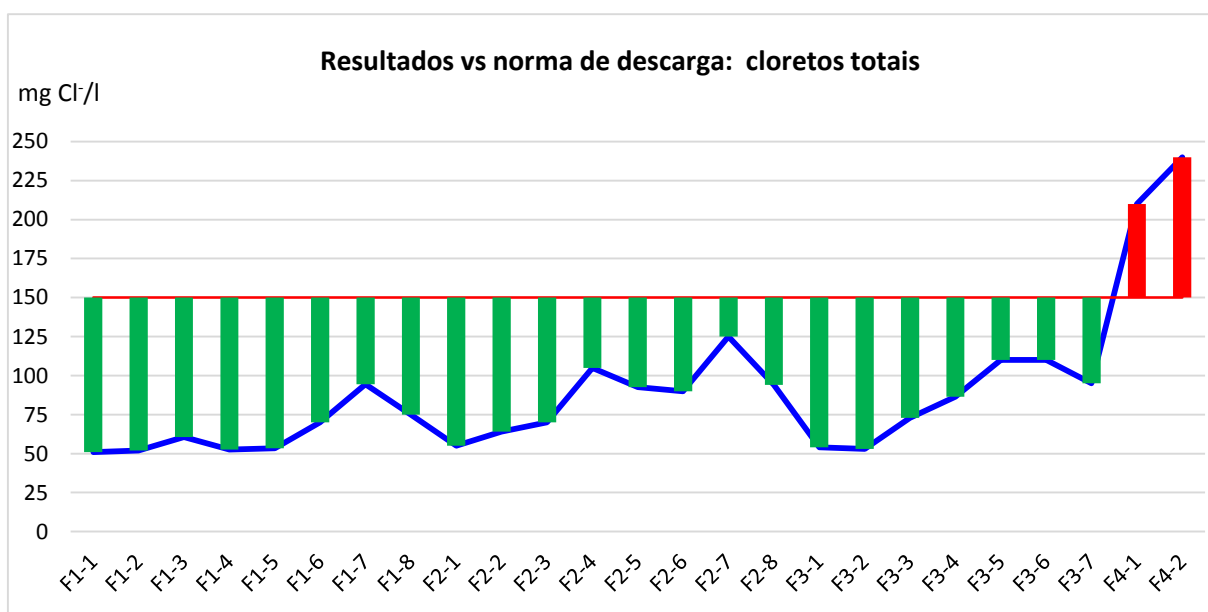


Figura 5.13 - Resultados vs norma de descarga: cloretos totais.

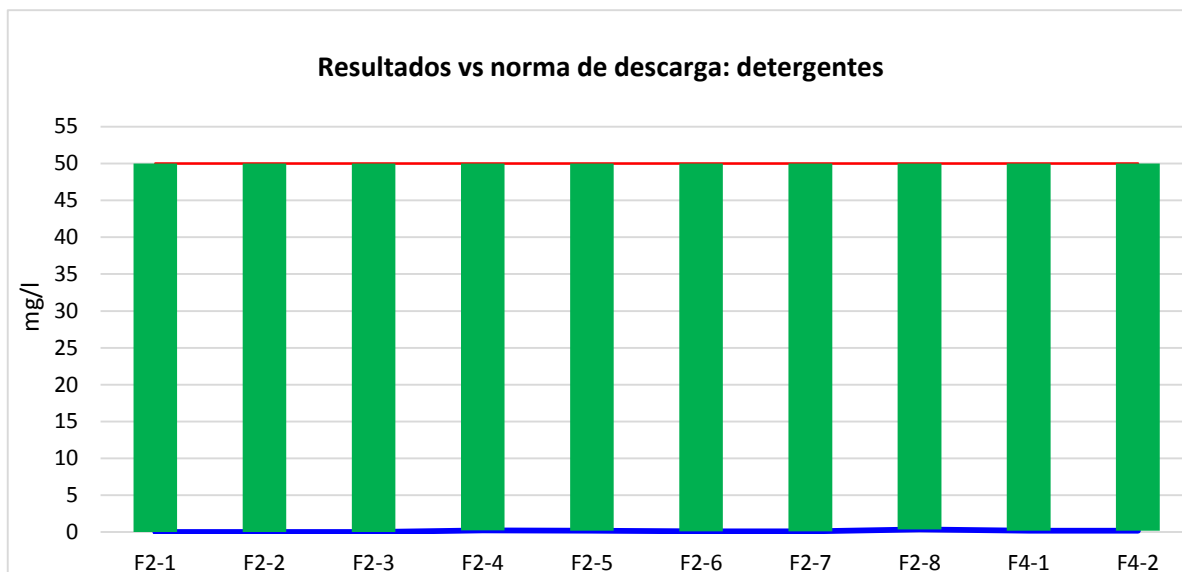


Figura 5.14 - Resultados vs normas de descarga: detergentes.

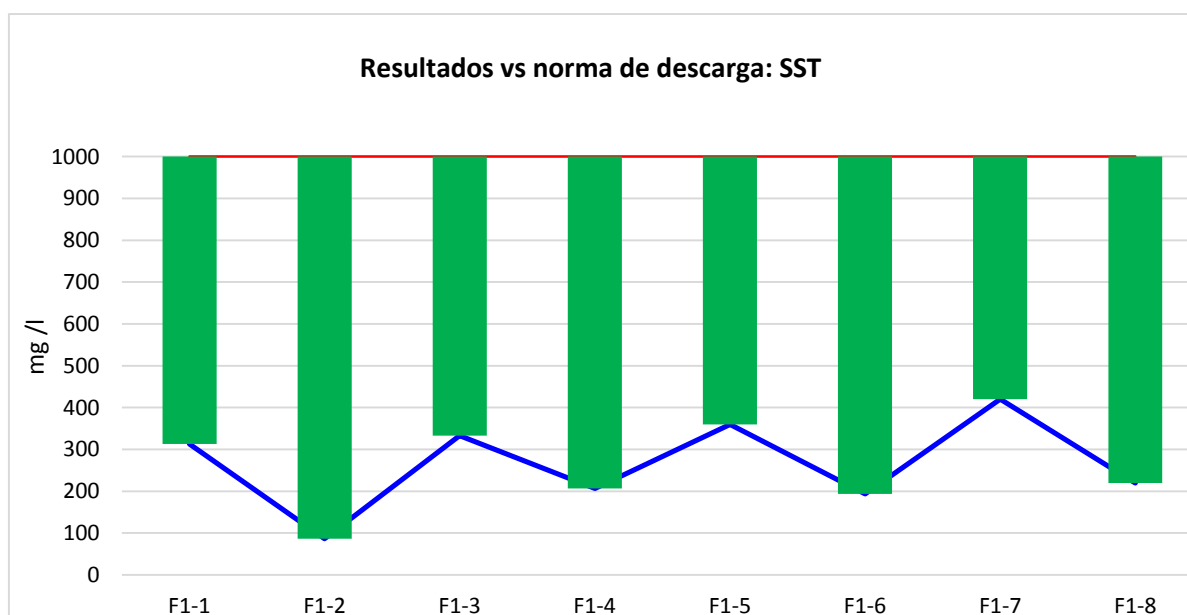


Figura 5.15 - Resultados vs normas de descarga: SST.

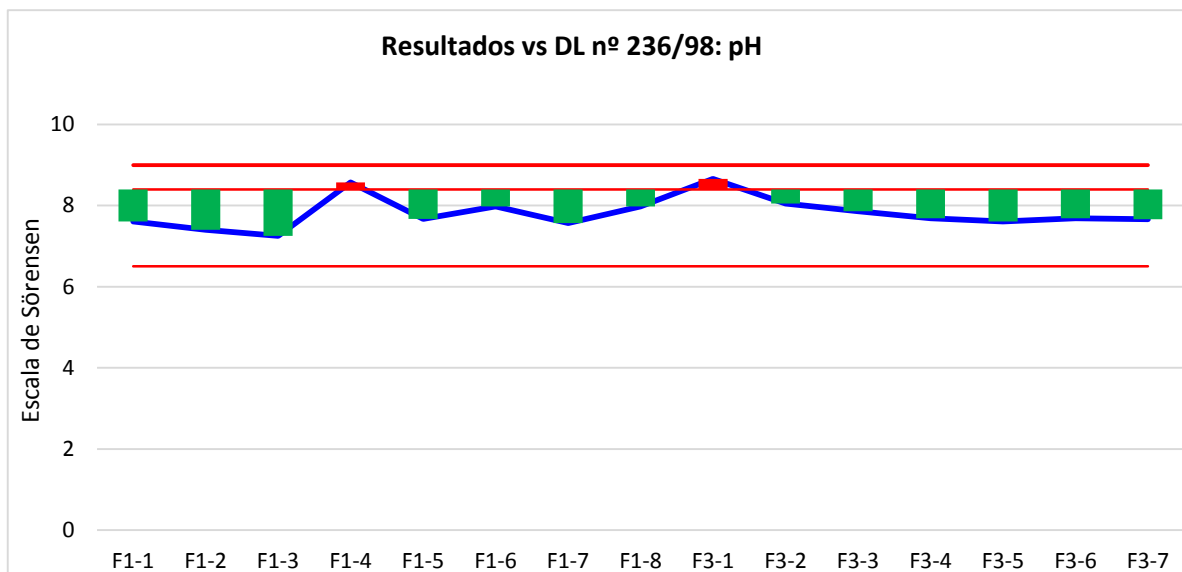


Figura 5.16 - Resultados vs DL nº 236/98: pH.

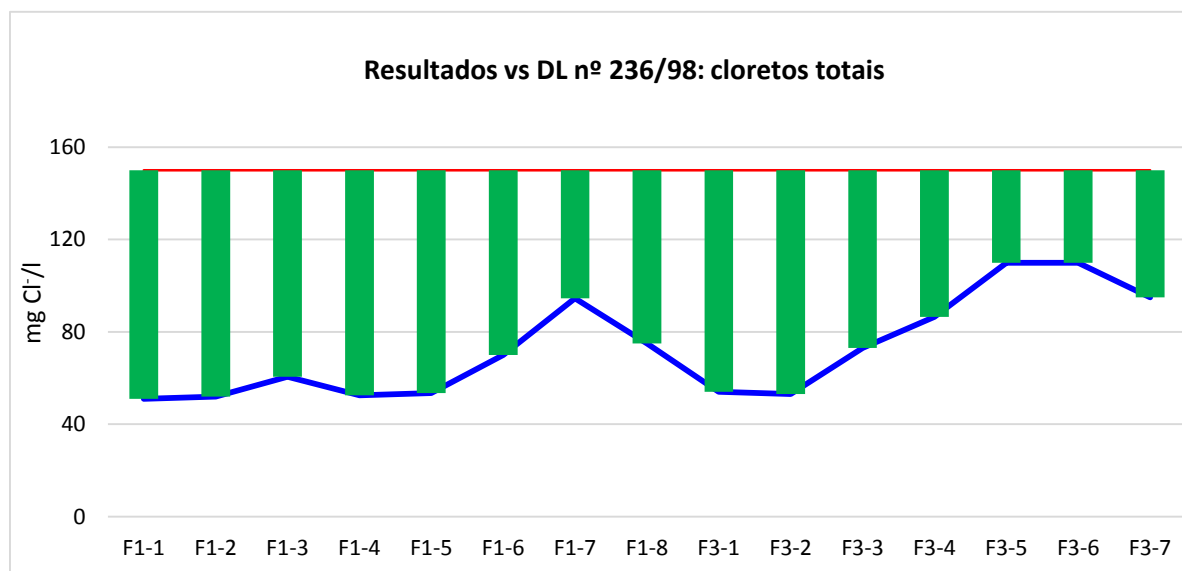


Figura 5.17 - Resultados vs DL nº 236/98: cloretos totais.

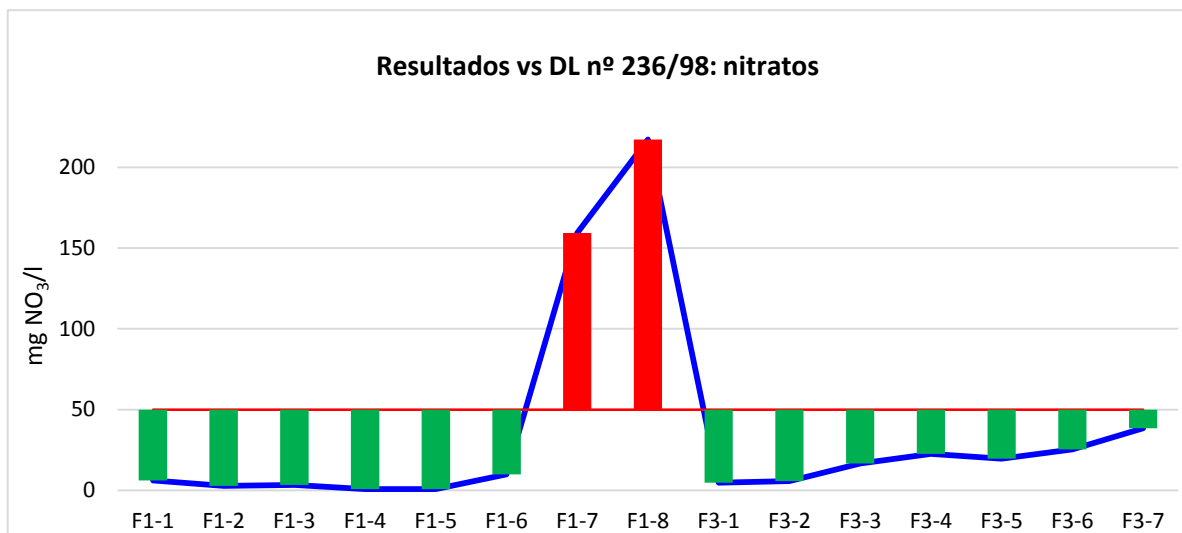


Figura 5.18 - Resultados vs DL nº 236/98: nitratos.

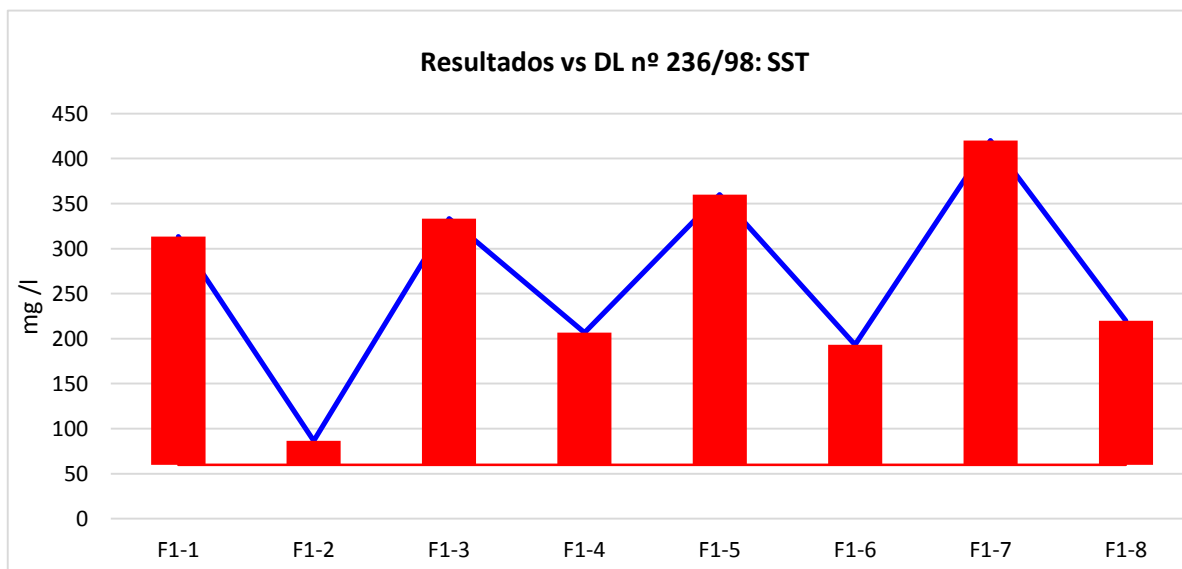


Figura 5.19 - Resultados vs DL nº 236/98: SST.

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1. Análise quantitativa

Os efluentes produzidos durante o período de 8 de Maio a 8 de Setembro de 2014 totalizaram um volume de 6.415,9 m<sup>3</sup>, o que corresponde a cerca de cinco vezes mais que a capacidade instalada da Algafarm. A capacidade instalada corresponde à capacidade total dos 19 PBR's existentes.

A diferença de volume de efluentes produzidos, por mês, deveu-se ao aumento de produção verificado na instalação, facto esse que já era expectável. Nos meses de temperaturas mais elevadas, Junho, Julho e Agosto, o nível de produção aumenta devido ao maior crescimento das culturas de microalgas, o que se traduz no aumento das colheitas. Tal facto implica, também, uma maior rotatividade de culturas e, por conseguinte, uma maior necessidade de limpeza dos PBR's. O número de limpezas por PBR varia consoante o seu tamanho, uma vez que um PBR S não mantém a mesma cultura durante o mesmo tempo que um PBR L. Durante os quatro meses que compreenderam a parte prática deste trabalho, os PBR's S tiveram um maior número de limpezas, resultando numa média de quatro limpezas por cada PBR. Cada PBR M foi limpo, em média, três vezes e nos PBR's L uma média de limpezas, por cada um, de duas vezes. No caso do maior PBR da Algafarm, o XL, este foi limpo duas vezes.

A figura 5.5 resume esta análise indicando a constituição dos efluentes produzidos por tipo de efluente. Pode-se constatar que o permeado representa a maior origem de efluentes, associando-se, este facto, à maior produção ocorrida nestes meses, e por isso, num maior volume processado e permeado não reutilizado. Tendo sido estudados os meses de maior produção de biomassa, e por conseguinte uma maior produção de efluentes, este trabalho desenvolveu-se no âmbito do pior cenário previsto.

### 6.2. Análise qualitativa

Numa primeira fase, esta análise incidiu sobre os parâmetros contidos nos *reports* automáticos produzidos através dos dados fornecidos pela sonda que se encontra no interior do depósito de efluentes. O conteúdo deste depósito não é reutilizável uma vez que é constituído pelos efluentes produzidos durante o processo de produção de microalgas, assim como, aqueles que provêm do edifício administrativo (incluindo wc's e duches). Assim, a análise destes dados consistiu na verificação do cumprimento das normas de descarga. É de realçar que os resultados

apresentados pelos *reports* do autómato advêm de uma leitura contínua, não sendo possível distinguir dos valores registados aquando das descargas efectuadas para o colector municipal.

Na figura 5.6 pode constatar-se a evolução do pH ao longo do período de estudo, na qual se verificou que os valores registados, frequentemente, excederam o limite estabelecido pela norma. O motivo pelo qual os valores ultrapassam os limites residui na presença considerável de detergente, que é fortemente alcalino. No entanto, não significa que a descarga tenha sido efectuada com os referidos valores de pH uma vez que no depósito ocorre uma mistura de diferentes tipos de efluentes, facto esse que conduz a uma diluição e neutralização dos referidos efluentes. Esta diluição e neutralização poderá resultar na descida do pH, fazendo com que este fique dentro dos limites da norma. Caso não se constate esta concordância, o depósito está preparado para adição de soluções ácidas de modo a corrigir o pH.

No caso da análise da temperatura, através da figura 5.7 verificou-se que os valores registados estão de acordos com a norma de descarga. A localização do depósito, no interior do pavilhão faz com que seja muito improvável que este parâmetro exceda o valor limite.

As figuras 5.8 e 5.9 mostram a evolução da condutividade e turvação, respectivamente, durante o intervalo de tempo estudado. Ambos os parâmetros estão muito abaixo dos estabelecidos pela norma, o que se deve à mistura dos diversos tipos de efluentes no interior do depósito.

Esta análise qualitativa de *reports* do autómato permitiu identificar sinais de alarme. Estes sinais de alarme têm como objectivo permitir ao operador antecipar potenciais situações de descargas de efluentes com parâmetros que possam não estar em conformidade. Através da análise efectuada constatou-se que o parâmetro com maior impacto é o pH, concretamente pH elevados, que se deveram à presença de detergente após utilização e reutilização do efluente. Assim, torna-se importante a correcta programação da recolha e descarga de detergente utilizado, de modo a garantir que se dilui e neutraliza com outros efluentes, ou que lhe é aplicado o tratamento adequado para diminuição do pH.

Outros sinais de alarme poderão ser desenvolvidos caso haja alterações dos produtos utilizados ou dos controlos automáticos efectuados no depósito de efluentes.

Numa segunda fase procedeu-se à análise qualitativa dos diversos fluxos identificados. Com o objectivo de perceber se a descarga directa, dos efluentes correspondentes a cada fluxo, cumpriria as normas de descarga. Foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos da análise dos fluxos e os limites máximos definidos na norma de descarga. Por outro lado, considerou-se relevante encontrar alternativas de reutilização dos vários fluxos, nomeadamente

a sua reutilização para rega, tendo-se efectuado uma comparação com os valores constantes no Anexo XVI do Decreto-Lei nº 236/98.

Quando se comparou os resultados das análises efectuadas aos fluxos com os parâmetros de descarga, verificou-se que para o parâmetro pH (figura 5.10) apenas os valores referentes ao fluxo 4 estavam acima dos limites de descarga, tendo-se obtido a mesma conclusão para os cloretos totais (figura 5.13). Estes resultados eram expectáveis, dado que o fluxo 4 correspondia ao detergente organoclorado após utilização. Realça-se que este detergente é diluído com outros efluentes previamente à sua descarga.

Relativamente aos parâmetros turvação, condutividade, detergentes e sólidos suspensos totais (figuras 5.11, 5.12, 5.14 e 5.15) todos os fluxos apresentaram valores dentro dos limites de descarga, isto é de acordo com a legislação aplicável.

Por último os resultados obtidos na análise dos fluxos 1 a 3 foram comparados com os parâmetros de qualidade da água para rega. O fluxo 4 – detergente após utilização – não foi considerado nesta análise dado tratar-se de detergente e não poder ser comparado com o Decreto-Lei nº 236/98.

As figuras 5.16 e 5.17 mostram que os valores de pH e cloretos totais, respectivamente, se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo referido Decreto-Lei. Apenas se realça um valor de pH que se encontrava acima do valor máximo admissível (8,4), mas que, no entanto, é inferior ao valor máximo recomendado que é de 9.

No caso dos nitratos, pela figura 5.18 constataram-se dois valores muito superiores aos estipulados pela legislação. Estes resultados tiveram origem na mudança da composição do meio nutritivo fornecido às microalgas, o qual possuía um maior teor de compostos azotados.

Finalmente, a figura 5.19 indica que todas as amostras analisadas referentes ao fluxo 1 ultrapassam os limites legais em sólidos suspensos totais. O que significa que o fluxo 1 possui uma elevada concentração de matéria, especialmente, orgânica.

### **6.3. Potenciais de reutilização**

A comparação dos resultados obtidos, para a água de cada fluxo com o Anexo XVI do Decreto-Lei nº 236/98 referente à qualidade da água para rega, permite definir o potencial de reutilização da água de cada fluxo, levando, por um lado a uma diminuição dos efluentes descarregados, assim como, a uma diminuição da água fresca utilizada.

As águas de enxaguamento 1 poderão ser utilizadas como água de rega, ou até mesmo como fertilizante. Além da análise anterior em que se verificou a concordância com a legislação, esta possível reutilização é, ainda, suportada pelo valor de Carbono Orgânico Total que foi apresentado na tabela 5.3. A junção do teor em Carbono Orgânico Total com a concentração de SST indica que estas águas são caracterizadas por uma elevada concentração de matéria orgânica. Como o teor de SST é muito superior ao que é estipulado pela legislação, a sua correcção poderá passar por duas possíveis soluções, nomeadamente (i) a diluição deste fluxo para ser utilizado como água de rega, ou (ii) concentrar este fluxo de modo a obter-se um fertilizante.

Esta aplicação de reutilização das AE1 é descrita na literatura consultada. Segundo Safi *et al.*, as cianobactérias ao produzirem uma quantidade considerável de compostos que influenciam o desenvolvimento e crescimento de plantas, torna-as num potencial biofertilizante. Mais especificamente, verificou-se que estes organismos produzem compostos reguladores de crescimento, vitaminas, aminoácidos, polipéptidos, substâncias antibacterianas e antifúngicas que exercem um controlo biológico de agentes fitopatogénicos, e polímeros como exopolissacarídeos que melhoram o crescimento e produtividade da planta. Além das cianobactérias, foi também estudado o efeito do extracto aquoso da *Chlorella vulgaris*, como adubo foliar no trigo, onde se avaliou o estado dos nutrientes, crescimento e produtividade da planta. Este estudo (Shaaban, 2001) constatou que uma pulverização (25 dias depois do trigo ser semeado) com uma concentração de extracto de algas de 50% (v/v) aumentou o crescimento em 140% e a produtividade em 40%. Por outro lado, outro estudo (Faheed e Fattah, 2008) mostrou o impacto de biofertilização da *Chlorella vulgaris* nos parâmetros de crescimento e respostas fisiológicas em sementes de *Lactuca sativa* que foram adubadas com a microalga. Os resultados foram avaliados após 3, 6, 9, 12 e 15 dias, onde foi verificado o aumento do peso das plântulas tal como o seu teor em pigmentos (Safi *et al.*, 2014).

No que diz respeito ao potencial de reutilização das águas de enxaguamento 2, estas podem ser utilizadas como AE1 ou até como água de inoculação. Os valores obtidos, pela análise dos vários parâmetros indicados na tabela 5.4, revelam que este tipo de fluxo apresenta características que se enquadram na aplicação deste, como água de inoculação. Os parâmetros que poderiam influenciar negativamente o desenvolvimento de culturas seriam o pH e o teor de detergentes. Contudo, estes apresentam valores baixos e aceitáveis para esta finalidade. No entanto, em algumas amostras deste tipo de fluxo, correspondentes a PBR's M e L, verificam-se elevadas concentrações de cloretos e carbono orgânico, facto esse que deveria ser explorado e verificado. Embora o teor de cloretos não seja muito prejudicial para o crescimento de



microalgas, o teor de carbono orgânico poderá eventualmente ser. O TOC representa a quantidade de matéria orgânica e no caso das AE2, esta matéria orgânica poderá corresponder não só a resíduos de cultura de microalgas mas, muito provavelmente, a outros organismos considerados contaminantes. Este teor está relacionado também com o tamanho do PBR, uma vez que, quanto maior for a capacidade de um PBR, maior será a probabilidade de apresentar elevados teores de matéria orgânica. Neste caso, utilizar este tipo de fluxo com elevado teor de matéria orgânica como água de inoculação, poderá estar a comprometer, desde o início, o crescimento e desenvolvimento de uma cultura de microalgas. Assim sendo, só se poderá utilizar como água de inoculação as AE2 provenientes de PBR's S, embora este também possa ser utilizado como AE1. As AE2 provenientes de PBR's M e L devem apenas ser utilizados como AE1.

Por fim, o permeado poderá ter várias utilizações, tais como, renovação de culturas, AE1, fertilizante e, ou rega. A Algarfarm tem previsto a reutilização de 90% do permeado produzido para reintrodução nas culturas após colheita. Esta reutilização não está ainda implementada dado que vários estudos demonstraram que este permeado terá que sofrer um tratamento prévio à sua reutilização, (tratamento que se encontra em estudo). Só esta alteração no processo permitirá uma diminuição imediata de 9.000 m<sup>3</sup>, correspondente aos quatro meses analisados. Este permeado corresponde a água com nutrientes que é retirada da cultura pelo sistema de membranas. Assim, enquanto não for implementada esta reutilização, o permeado apresenta todas as características para ser utilizado directamente como água de rega, ou concentrado para produção de fertilizante.

#### **6.4. Plano de gestão de efluentes**

O plano de gestão proposto visa essencialmente reduzir o volume das descargas realizadas através da reutilização dos fluxos produzidos, o que indirectamente também contribuirá para a diminuição dos consumos de água. Deste modo, a Algarfarm poderá reduzir gastos, tanto com o consumo de água fresca, como com as descargas, podendo, ainda, maximizar o lucro, caso proceda ao comércio de águas ricas em nutrientes para fins agrícolas ou até mesmo desenvolver fertilizantes.

A gestão dos efluentes assenta, essencialmente, em três propostas relativas aos três tipos de fluxos analisados, AE1, AE2 e permeado, com tempos e custos de implementação diferentes.

### Proposta 1 – Curto prazo

A primeira proposta refere-se à reutilização das AE2 e permeado como AE1, sem que para isso haja necessidade de alterar a dinâmica de funcionamento da Algafarm. Contudo, terá de haver uma coordenação com a calendarização e organização das tarefas a serem executadas. Isto é, será importante verificar os PBR's que estão em limpeza e os que vão iniciar este procedimento para que se proceda ao aproveitamento da AE2 como AE1 dos PBR's que serão limpos. Outro aspecto a ter em consideração será averiguar a frequência de colheitas com os PBR's vazios e, ou que serão limpos. Uma vez que os volumes excedentes das membranas são elevados e, na ausência de um depósito com capacidade para armazenar a sua totalidade, será uma mais valia conseguir conciliar as necessidades decorrentes daquele processo e utilizar o volume excedente das membranas (permeado) como AE1.

A utilização do permeado para renovar culturas, também, é incluída nesta proposta. Desta forma, além de se poder gastar menos água fresca, também se poupará na adição de meio nutritivo, uma vez que este está presente no permeado.

A realização da primeira parte desta proposta leva a uma redução do consumo de água fresca de, aproximadamente, 570 m<sup>3</sup> por mês. No caso de o permeado ser utilizado na renovação de culturas, o consumo de água fresca é reduzido em 2.300 m<sup>3</sup> por mês, considerando uma taxa de reutilização do permeado de 90 %.

A implementação desta proposta levaria à inexistência de águas de enxaguamento 1, logo ao não consumo de aproximadamente 570 m<sup>3</sup> por mês de água fresca, assim como uma redução do mesmo volume em efluentes descarregados.

### Proposta 2 – Médio prazo

A segunda proposta é possivelmente mais complexa e apresenta custos de implementação. Esta proposta passa pela implementação de metodologias de reutilização de todas as águas de enxaguamento 1 (independentemente da sua origem: água fresca ou água reutilizada) e do permeado excedente como água de rega ou fertilizante.

A sua utilização como água de rega implica a sua mistura com água fresca, assim como a aquisição de um depósito ou de uma bacia para se efectuar esta mistura. Esta água de rega poderia ser utilizada internamente nas zonas ajardinadas da Algafarm, bem como, nas restantes zonas ajardinadas da fábrica da Cibra. Poderiam ainda ser encontradas parcerias com agricultores locais que recolheriam a água na Algafarm e posteriormente a aplicariam nas suas

culturas. Esta parceria apresenta benefícios para ambas as partes uma vez que a Algafarm reduziria o seu volume de efluentes e os agricultores locais obteriam uma água rica em nutrientes, permitindo a redução no consumo de fertilizantes / adubos utilizados.

Esta proposta levaria, no mínimo, a uma diminuição de 570 m<sup>3</sup> de descarga de efluentes. Se implementada em conjunto com a proposta 1, a Algafarm reduziria, mensalmente, cerca de 1.100 m<sup>3</sup> de descarga de efluentes.

### Proposta 3 – Médio/longo prazo

Esta última proposta consiste, basicamente, na optimização da proposta 2. Ou seja, em vez de se reutilizarem os volumes de AE1 como água de rega, estes serviram de base para a produção de fertilizantes. Esta alternativa implica um investimento para que seja possível a produção de um novo produto da Algafarm, mas, desta forma, será também criado valor económico, levando a um aumento da rentabilidade, a par, com a produção de microalgas já realizada na Algafarm.



## 7. CONCLUSÕES

A produção de microalgas à escala industrial é um processo exigente com desafios distintos da industrial tradicional. A Algafarm é a única unidade de produção deste género em Portugal, tendo dado oportunidade ao desenvolvimento de um trabalho inovador na área do tratamento de efluentes deste tipo.

A produção de microalgas é efectuada em fotobiorreactores (PBR's) concebidos especialmente para o efeito, tendo a Algafarm uma capacidade instalada de 1.300 m<sup>3</sup>. A produção de microalgas em pó resulta num elevado consumo de água, assim como, uma elevada produção de efluentes aquando do descarte dessa mesma água.

O trabalho desenvolvido na Algafarm teve como objectivo quantificar e caracterizar os efluentes aí produzidos através da sua sistematização (sob a forma de fluxos), assim como avaliar potenciais de reutilização dos mesmos.

As análises quantitativa e qualitativa levaram a uma caracterização de cada tipo de efluente e permitiram a identificação de sinais de alarme, sinais que a operação da instalação deve ter em consideração aquando da produção de determinados efluentes garantindo assim, o cumprimento dos parâmetros de descarga.

Esta análise permitiu apresentar três propostas de redução/reutilização dos efluentes produzidos, uma passível de implementação imediata, e duas para implementação a médio e longo prazo dado implicarem investimento em equipamentos. Paralelamente, estas propostas de reutilização conduzem, ainda, a uma diminuição no consumo de água fresca, aumentando assim, ainda mais, a sustentabilidade do projecto Algafarm.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☼ American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*. Washington: 22 nd Edition.
- ☼ Benemann, J.R. (1997). CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy Convers. Mgmt*, Vol. 38, Suppl., pp. S475-S479.
- ☼ Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 313-321.
- ☼ Brennan, L. e Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - A Review of technologies for production, processing, and extractions of bio-fuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, pp. 557-577.
- ☼ Chen, C.Y.; Yeh, K.L.; Aisyah, R.; Lee, D.J. e Chang, J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102, pp. 71–81.
- ☼ Clarens, A.F.; Resurreccion, E.P.; White. M.A. e Colosi, L.M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental Science & Technology*, 44, pp. 1813–1819.
- ☼ Collet, P.; Hélias, A.; Lardon, L.; Ras, M.; Goy, R.-A.; Steyer, J.-P. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102, pp. 207–214.
- ☼ Decreto-Lei nº 236 de 1 de Agosto de 1998, anexo XVI. *Ministério do Ambiente*.
- ☼ Duarte, S.I.S. (2013). Estudo da Produção de Microalgas a Partir de Águas Residuais – Relatório de Estágio. *Instituto Politécnico de Tomar - Escola Superior de Tecnologia de Tomar*.
- ☼ Eriksen, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30, pp. 1525-1536.
- ☼ Faheed, F.A. e Fattah, Z.A.-E. (2008). Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 4, pp. 165–169.

- ✿ Fernández, F.G.A.; Sevilla, J.M.F. e Grima, E.M. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 12, pp. 131–151.
- ✿ Jorquera, O.; Kiperstok, A.; Sales, E.A.; Embiruçu, M. e Ghirardi, M.L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101, pp. 1406–1413.
- ✿ Lam, M.K. e Lee, K.T. (2012). Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30, pp. 673–690.
- ✿ Lundquist, T.J.; Woertz, I.C.; Quinn, N.W.T. e Benemann, J.R. (2010). A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. *Energy Biosciences Institute – University of California*.
- ✿ Marques, A.C.E. (2014). Produção de biohidrogénio por cianobactérias: Optimização da produção de biohidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 wild type e mutantes. *Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia*.
- ✿ Mata, T.M.; Martins, A.A. e Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, pp. 217–232.
- ✿ Medeiros, D.L.; Sales, E.A. e Kiperstok, A. (2014). Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance. *Journal of Cleaner Production*, pp. 1–8.
- ✿ Priyadarshani, I. e Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utln.*, 3 (4), pp. 89–100.
- ✿ Regulamento nº 461 de 17 de Maio de 2010, Anexo I do Artigo 51º. Regulamento Municipal do Serviço de Distribuição de Água. *Serviços Municipalizados da Câmara Municipal de Alcobaça*.
- ✿ Rosa, J.M.C. (2011). Modelação e Optimização de uma Unidade de Produção de Microalgas. *Universidade de Coimbra*.
- ✿ Russo, D.A.M.T. (2011). Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. *Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia*.



- ☼ Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.Y. e Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp. 265–278.
- ☼ Sander, K. e Murthy, G.S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *Int J Life Cycle Assess*, 15, pp. 704–714.
- ☼ Santos, J.O.; Leitão, A.L. e Fernando A.L. (2008). Protocolos da disciplina de Técnicas Laboratoriais em Ambiente. *Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia*.
- ☼ Shaaban, M.M. (2001). Green microalgae water extracts as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, pp. 628–632.
- ☼ Singh, A. e Olsen, S.I. (2011). A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Applied Energy*, 88, pp. 3548–3555.
- ☼ Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E. e Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2), pp. 87-96.
- ☼ Stephenson, A.L.; Kazamia, E.; Dennis, J.S.; Howe, C.J.; Scott, S.A. e Smith, A.G. (2010). Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels*, 24, pp. 4062–4077.
- ☼ Ugwu, C.U.; Aoyagi, H. e Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, pp. 4021–4028.
- ☼ Walker, T.L.; Purton, S.; Becker, D.K. e Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep*, 24, pp. 629–641.
- ☼ Yang, J.; Xu, M.; Zhang, X.; Hu, Q.; Sommerfeld, M. e Chen, Y. (2011). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102, pp. 159–165.

**Recursos online:**

- 🌀 <http://www.allma.com/pt/microalgas> (acedido em Fevereiro de 2015).
- 🌀 <http://biotex.ibss.org.ua/gallery/8/?catid=8&lang=en> (acedido em Março de 2015).
- 🌀 [https://healthyposts.files.wordpress.com/2013/09/chlorella\\_image2\\_cells\\_290711.jpg](https://healthyposts.files.wordpress.com/2013/09/chlorella_image2_cells_290711.jpg) (acedido em Março de 2015).
- 🌀 [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Fotobiorreatores&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Fotobiorreatores&lang=3) (acedido em Março de 2015).
- 🌀 <http://www.mc-100.com/M-74/m-74.html> (acedido em Março de 2015).
- 🌀 <http://zdraveriasy.webnode.sk/mikroriasy/haematococcus-pluvialis/> (acedido em Março de 2015).

## ANEXO I

### pH e condutividade

O método potenciométrico utilizado recorre ao uso de um instrumento designado por *pH Meter*, da marca HANNA (figura A.1). A análise destes parâmetros decorreu em simultâneo, uma vez que o *pH Meter* realiza estas análises ao mesmo tempo. Assim, foi necessário colocar cerca de 50ml de amostra num copo de plástico e, de seguida, introduz-se o *pH Meter*. Aguarda-se até que a leitura destes parâmetros seja executada. Os resultados da leitura aparecerão no display e são registados manualmente.



Figura A.1 - *pH Meter*.

### Turvação

No caso da turvação, o método turbidimétrico foi realizado através da utilização da sonda do modelo *SOLITAX sc*, da HACH-LANGE, que se encontra localizada em cada PBR e cujos valores ficam registados automaticamente nos *reports*, já referidos anteriormente. Assim, quando se procedeu à recolha das amostras, teve de se ir retirar os valores de turvação no mesmo momento aos registos do autómato. Este procedimento foi aplicado a todas as amostras de águas de enxaguamento e detergente que foram alvo de análise individual, ou seja, que não foram analisadas como amostras compostas. Para as restantes amostras de águas de enxaguamento analisadas através de amostras compostas e para as amostras do permeado teve de se recorrer ao uso da mesma sonda de um PBR que se encontrava vazio para limpeza. Deste modo, a sonda utilizada foi a do L1. Foi necessário manter condições de ausência de luz para obter resultados fiáveis devido à grande sensibilidade deste tipo de sondas. Por isso, utilizou-se um recipiente opaco onde se colocaram as referidas amostras e, de seguida, colocou-se a sonda nesse recipiente e aguardou-se pela leitura. Esta leitura ficou registada no autómato, onde posteriormente foram retirados os valores obtidos.

### Azoto total

O azoto total foi analisado externamente. Assim sendo, as amostras foram enviadas para um laboratório acreditado. O procedimento do método decorreu de acordo com a EN 12260.

## Cloretos totais

A determinação deste parâmetro foi realizada através do kit HI3815 da HANNA (figura A.2), cujo método se baseia na titulação de nitrato de mercúrico, que se encontra no SMEWW. Este teve de ser testado de modo a perceber-se o seu nível de fiabilidade.



Figura A.2 - Kit para a análise de cloretos (HI3815).

Para a realização deste teste, teve de se preparar uma solução cuja concentração de cloretos totais é conhecida. Esta solução foi preparada através de Cloreto de Sódio (NaCl), em pó, em que:

$$M(\text{NaCl}) = 58,44 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{Cl}^-) = 35,45 \text{ g/mol}$$

Pretende-se preparar uma solução de concentração de 90mg/l de cloreto. De modo a determinar a quantidade exacta de NaCl necessária para obter a solução desejada, efectuou-se a seguinte analogia.

Tendo por base que a massa molar do Cloreto de Sódio é de 58,44g/mol e que destas 35,45g correspondem à massa molar do ião cloreto, então para se saber a quantidade de Cloreto de Sódio, designada por X, a utilizar na preparação de uma solução com 0,09g de cloreto:

$$X = \frac{58,44 \times 0,09}{35,45} \Leftrightarrow X = 0,15 \text{ g de NaCl}$$

Para tal, pesaram-se 0,15 g de NaCl na balança analítica PA114 da OHAUS (figura A.3), e foram colocadas num balão volumétrico de um litro e perfez-se com água destilada. Promoveu-se a agitação de modo a homogeneizar a solução e, de seguida, foi analisada uma amostra desta solução recorrendo ao kit para que este seja validado.

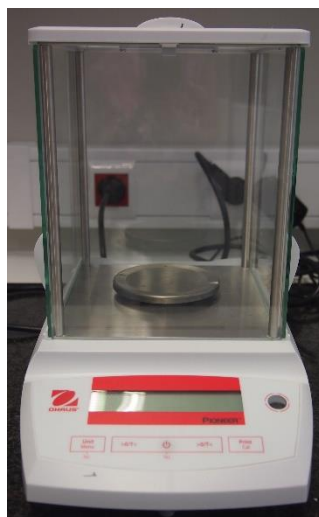


Figura A.3 - Balança analítica.

A quantidade de amostra a utilizar depende da gama de resultados que se esperam obter, ou seja, a gama baixa compreende concentrações de cloreto até 100mg/l e na gama alta as concentrações vão até 1000mg/l. Refere-se, ainda, que todas as análises foram realizadas em duplicado.

Posto isto, a validação do método inclui-se na gama baixa e, para tal, o volume de amostra necessário foi de 50 ml. Colocou-se este volume no copo graduado grande incluído no kit. De seguida, adicionaram-se duas gotas do indicador *Diphenylcarbazone* e agitou-se, de modo a que a cor da amostra se torne violeta avermelhada. Depois de a cor obtida se encontrar homogeneizada, adiciona-se, gota a gota e agitando sempre, a solução de ácido nítrico. Este passo decorre até que a amostra mude para a cor amarela. Posteriormente, coloca-se a seringa de titulação cheia com solução de nitrato mercúrico no orifício localizado no topo do copo. Adiciona-se lentamente esta solução gota a gota, agitando em simultâneo o copo, continuamente até que a amostra passe da cor amarela para violeta. Esta mudança de cor corresponde à finalização da análise, cuja concentração de cloretos presentes na amostra corresponde à quantidade de nitrato mercúrico que foi adicionado. Os resultados são obtidos através da média do volume gasto de nitrato mercúrico dos duplicados, o qual é multiplicado pelo factor de conversão correspondente à gama utilizada. Neste caso, como se analisou a amostra na gama baixa, o factor de conversão foi de 100. Desta forma, obteve-se a concentração de cloretos totais expressa em mg/l ou ppm e que, efectivamente correspondeu à concentração conhecida da solução preparada, ou seja, 90 mg/l. Tal confirma a fiabilidade do método através do uso do kit.

Posteriormente, passou-se para a análise de cloretos de todas as amostras. O procedimento é igual ao descrito na validação do método. Todas as amostras foram avaliadas em gama baixa, sendo

que algumas excediam a concentração máxima. Assim sendo, estas tiveram de ser novamente analisadas segundo a gama alta. Esta gama exige um menor volume de amostra, apenas 5ml. De resto, todo o procedimento se mantém até à expressão dos resultados obtidos. Neste caso, o factor de conversão da gama alta corresponde a 1000. Fazendo a média do volume de nitrato mercúrico dos duplicados e multiplicando-o por este factor, obtém-se a concentração de cloretos totais correspondente à gama alta.

### Detergentes

No parâmetro referente aos detergentes, a análise efectuada incide sobre os compostos lauril-sulfato. Esta análise foi realizada externamente num laboratório acreditado. O método foi realizado de acordo com o método do MBAS do SMEWW, capítulo 5540 C, e da EN 903.

### Fosfatos

No caso da análise aos fosfatos, esta decorreu segundo o método espectrofotométrico interno. Este método baseia-se na leitura de absorvâncias no UV, a 716nm. Com os valores das leituras e através da recta de calibração do método, obtém-se as concentrações de fosfatos.

Para esta análise é necessário centrifugar as amostras, utilizando a centrífuga Z400K da HERMLE (figura A.4), durante 15 min, a uma velocidade de 3500 rpm. Para tal, colocaram-se as amostras em tubos Falcon de 15ml e procedeu-se à centrifugação destas. Posteriormente, realizou-se a análise ao sobrenadante, em duplicado, e foi necessário preparar o branco dos fosfatos que foi tratado como uma amostra. A preparação do branco e das amostras foi efectuada em tubos de vidro.



Figura A.4 - Centrífuga.

Posto isto, para o branco colocou-se 2ml de H<sub>2</sub>O desmineralizada no tubo e no caso das amostras utilizaram-se 2ml do sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 45µL do reagente denominado por PO<sub>4</sub>#1 e agitou-se no vórtex da VELP Scientifica (figura A.5).



Figura A.5 - Vórtex.

O passo seguinte corresponde à adição de 45µL do reagente denominado por PO<sub>4</sub>#2 e levou-se novamente ao vórtex. Por fim, adicionaram-se 14µL do reagente denominado por PO<sub>4</sub>#3 e agitou-se, mais uma vez, no vórtex. Aguarda-se 5 minutos e procede-se à leitura no espectrofotómetro UV – VIS GENESYS 10S da THERMO SCIENTIFIC (figura A.6), no programa destinado a esta análise. O branco é colocado na cuvete indicada para este e as amostras colocam-se nas restantes cuvetes. Por fim, os valores de absorvância, que se obtiveram, aplicaram-se na recta de calibração. Deste modo, calculou-se a concentração de fosfatos nas amostras.

## Nitratos

A análise de nitratos foi realizada segundo um método espectrofotométrico interno. Este método tem por base a medição de absorvâncias no UV. Com as absorvâncias obtidas e recorrendo à recta de calibração do método, são obtidas as concentrações de nitratos das diversas amostras.

Visto ser um método espectrofotométrico, caso a amostra tenha partículas em suspensão, estas irão interferir na leitura das absorvâncias. Por isso, é necessário centrifugar a amostra e a análise efectua-se ao sobrenadante desta. Esta operação ocorre na centrífuga Z400K da HERMLE (figura A.4), durante 15 min, a uma velocidade de 3500 rpm. Posto isto, todas as amostras, excepto as

correspondentes ao fluxo 2, tiveram de passar pela centrifugação. O volume de amostra a centrifugar foi de 10 ml.

Após se obter o sobrenadante das amostras centrifugadas, inicia-se então a análise aos nitratos, sempre em duplicados. Tratando-se de um método espectrofotométrico, é necessária a preparação de um branco que é tratado como uma amostra. Assim o branco dos nitratos é preparado com 9,7ml de H<sub>2</sub>O desmineralizada, à qual se adicionam 0,3ml de ácido clorídrico a 1M. Quanto às amostras, são necessários 9,7 ml destas ou do seu sobrenadante, consoante o caso, e a este volume adiciona-se 0,3ml de HCl a 1M. De seguida, Coloca-se o branco na cuvete destinada a este, e as amostras, em duplicado, nas restantes cinco cuvetes e procede-se à leitura espectrofotómetro *UV – VIS GENESYS 10S* da THERMO SCIENTIFIC (figura A.6), no programa criado especificamente para a análise de nitratos. Esta leitura é feita a diferentes comprimentos de onda, 220nm e 275nm. Obtendo as absorvâncias em duplicado, faz-se a média destas para cada comprimento de onda e este valor médio, é inserido na recta de calibração. Deste modo, obtêm-se os resultados finais correspondentes à concentração de nitratos presente na amostra.



Figura A.6 - Espectrofotómetro.

Neste método, o facto de a amostra e/ou sobrenadante estarem muito concentrados vai interferir com a leitura das absorvâncias. Deste modo, foi necessário efectuar uma diluição de 1:10, a todas as amostras. Ou seja, utiliza-se 1ml da amostra/sobrenadante e adiciona-se a esta 0,3ml de HCl a 1M e 8,7 ml de H<sub>2</sub>O desmineralizada. E procede-se à sua leitura. No caso de esta diluição não ter sido suficiente, então aumentou-se a diluição para 1:20. Assim foram necessários 0,5ml da amostra/sobrenadante, ao qual se adicionaram 0,3ml de HCl a 1M e perfez-se até os 10ml com H<sub>2</sub>O



desmineralizada, ou seja, adicionaram-se 9,2ml desta. Por fim, segue-se o procedimento descrito em cima e obtêm-se as concentrações de nitratos para cada amostra analisada.

#### SST

A determinação dos sólidos suspensos totais presentes nas amostras do fluxo 1, é realizada através da adaptação do método gravimétrico do SMEWW. Para a realização deste método são necessários equipamentos e materiais específicos, os quais tiveram de ser adaptados ao método do SMEWW devido a não existirem no laboratório. Assim sendo, recorreu-se ao uso da bomba de vácuo ZX-1B da COMECTA (figura A.7), filtros de fibra de vidro de poro  $0,7\mu\text{m}$  e diâmetro 47mm da marca VWR, e a balança de humidade DBS 60-3 da KERN (figura A.8) que foi programada para funcionar a  $105^{\circ}\text{C}$ . Esta balança seca a amostra e após peso constante, dá o resultado final.



Figura A.7 - Bomba de vácuo.

O primeiro passo deste procedimento corresponde em obter a tara do prato com os filtros que serão utilizados para a análise de cada amostra. Esta é obtida através da pesagem, na balança de humidade, do prato com os dois filtros a serem utilizados. Realiza-se a pesagem três vezes e faz-se a média dos valores obtidos que irá corresponder à tara final do prato e filtros. Após este passo, são filtrados, através da bomba de vácuo, 25 ml da amostra em cada filtro, resultando num total de 50ml de volume filtrado. Posteriormente, colocam-se os filtros no prato e levam-se à balança de humidade. A balança irá secar a matéria filtrada a  $105^{\circ}\text{C}$  e o seu peso é apresentado no display desta. Esta pesagem é, também, realizada três vezes e efectua-se a média dos valores obtidos. A concentração dos SST corresponde à diferença do peso da matéria filtrada com a tara do prato e filtros, dividindo este valor pelo volume total de amostra filtrada, que neste caso foi de 50 ml.



Figura A.8 - Balança de humidade.

#### TOC

A análise deste parâmetro foi realizada externamente, num laboratório creditado. O método utilizado pelo laboratório em questão é um método que está de acordo com as EN 1484, EN 13370 e SMEWW 5310.